

**DOCTORADO EN CIENCIAS Y
BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS**

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA A BAJAS TEMPERATURAS
EN FRUTOS DE BANANO cv “ENANO GIGANTE”**

Tesis que para obtener el grado de
Doctor en ciencias presenta:

José Humberto Caamal Velázquez

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México.
2008



DEDICATORIA

Con todo mi amor y respeto a Suemy Terezita Echeverría Echeverría,
por su amor, paciencia y sabiduría.

Muy especial a William Alberto Caamal Echeverría por ser mi batería
en los momentos difíciles

A mis abuelos Esther, Alberto, Elsa y Teodoro, por enseñarme a hacer
mejor cada día.

A mis Padres por su amor, comprensión y apoyo que me han brindado
en toda mi vida.

A mis hermanas Eloina y Marisol por su cariño y fuerza que nos une.

A mis maestros por el conocimiento otorgado, durante mi formación
profesional.

A mis amigos y compañeros por su amistad brindada.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Centro de Investigación Científica de Yucatán la oportunidad de realizar los estudios de doctorado en Ciencias y Biotecnología de Plantas en sus instalaciones y bajo la dirección y respaldo del Dr. Luís Carlos Rodríguez Zapata quien mostró interés y disposición para la realización de este trabajo.

Se agradece el apoyo económico otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca No. 182875 y a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) por el proyecto COI-1714 para la realización de esta tesis.

De manera especial agradezco el apoyo técnico del M.C. Bartolomé H. Chi Manzanero así como el de la M.C. Leticia Peraza Echeverría, la Q.F.B. Martha Patricia Flores Pérez, la Q.I. Ángela Ku González, y al M.C. Iván Cordova Lara a lo largo del trabajo realizado.

Gracias a los compañeros del laboratorio y del Posgrado: Daniel Hernández Portilla, Juan Canche Yam, Flor Herrera Erosa, Mayra Montero Cortez, Eliel Ruiz May por el apoyo en diversas etapas de mi trabajo.

Gracias a mis padres Angélica y Humberto por el amor y apoyo que me brindaron siempre. Por último, muy especial agradecimiento le doy a mi esposa Suemy Terezita Echeverría e hijo William por el respaldo, paciencia y amor mostrado. Muchas gracias a todos.

Este trabajo se efectuó en la Unidad de Biotecnología, en el laboratorio de estrés abiótico del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

CONTENIDO

| | |
|---|------|
| Agradecimientos | i |
| Dedicatoria | ii |
| Lista de tablas | vi |
| Lista de figuras | vii |
| Lista de abreviaturas | viii |
| Resumen | 1 |
| Summary | 3 |
| Introducción | 5 |
| Bibliografía | 5 |
| CAPITULO 1. ANTECEDENTES | |
| 1.1 Estrés abiótico y daño por descenso de temperatura (Chilling Injury). | 5 |
| 1.2 Transducción de señales en respuesta a bajas temperaturas | 6 |
| 1.3 Despliegue diferencial | 16 |
| 1.4 Historia, Origen y Taxonomía de los Plátanos y Bananos | 18 |
| 1.5 Importancia del Banano y Plátano | 20 |
| 1.6 Proceso de maduración de Banano y su relación con la lectinas | 22 |
| 1.7 Catalasa de plantas, función y activación en estreses abiótico | 26 |
| 1.8 Justificación y Objetivos | 28 |
| 1.8.1 Justificación | 28 |
| 1.8.2 Hipótesis | 29 |
| 1.8.3 Objetivo general | 29 |
| 1.8.4 Objetivos específicos | 29 |
| 1.9 Bibliografía | 30 |
| CAPITULO 2. LOW TEMPERATURE INDUCE DIFFERENTIAL EXPRESSION GENES IN BANANA FRUITS 41 | |
| 2.1 Abstract | 41 |
| 2.2 Introduction | 41 |
| 2.3 Material and Methods | 43 |
| 2.3.1 Fruit material | 43 |
| 2.3.2 RNA extraction | 43 |
| 2.3.3 mRNA differential display | 44 |
| 2.3.4 Silver staining | 44 |
| 2.3.5 Cloning and sequencing | 45 |
| 2.3.6 Northern Blot and Dot blot hybridizations | 45 |
| 2.4 Results | 46 |
| 2.4.1 Low temperatura symptoms and total RNARNA integrity | 46 |
| 2.4.2 mRNA differential display | 47 |
| 2.4.3 Northern blot and dot blot hybridizations | 49 |
| 2.5 Discussion | 51 |
| 2.6 acknowledgements | 53 |
| 2.7 References | 54 |

| | |
|--|----|
| CAPITULO 3. BANANA FRUIT-CATALASE 2 (<i>MaCat 2</i>) IS SPECIFICALLY EXPRESSED IN RESPONSE TO LOW TEMPERATURE AND MECHANIC DAMAGE | 59 |
| 3.1 Abstract | 59 |
| 3.2 Introduction | 59 |
| 3.3. MATERIAL Y METHODS | 61 |
| 3.3.1. Material and stress induction treatments | 61 |
| 3.3.2. Total RNA extraction | 62 |
| 3.3.3. Isolation of the 5' end of Cat2 transcript by 5' RACE Invitrogen GeneRacer kit | 62 |
| 3.3.4. Sequence data and phylogenetic analysis | 63 |
| 3.3.5. RNA Blot Analysis | 63 |
| 3.3.6. DNA-Blot Analysis | 64 |
| 3.3.7. RT-PCR Analysis of Differentially Expressed Genes. | 64 |
| 3.4. RESULTS | 64 |
| 3.4.1. Full length sequence cDNA of banana catalase 2 | 64 |
| 3.4.2. Effects of abiotic stresses in the Cat2 expression in fruits and banana plants | 66 |
| 3.4.3. DNA-DNA hybridization experiments | 68 |
| 3.4.4. Phylogenetic analysis of <i>MaCat2</i> | 69 |
| 3.5. DISCUSIÓN | 73 |
| 3.6. ACKNOWLEDGMENTS | 76 |
| 3.7. REFERENCES | 77 |
| CAPITULO 4. DISCUSIÓN GENERAL | 83 |
| 4.1 Discusión general | 83 |
| 4.2 Bibliografía | 88 |
| CAPITULO 5. CONCLUSION GENERAL | 93 |
| 5.1 Conclusión general | 93 |
| CAPITULO 6. PERSPECTIVAS | 95 |
| 6.1 Perspectivas del trabajo | 95 |

LISTA DE TABLAS

| | | |
|----------------------|---|----|
| Tabla 1.2.1 | Genes reportados relacionados con la tolerancia a las bajas temperaturas. | 16 |
| Tabla 2.4.2.1 | Bananas peel genes that are differentially expressed during low temperature treatment. | 48 |
| Tabla 2.4.2.2 | Bananas pulp genes that are differentially expressed during low temperature treatment. | 49 |
| Tabla 3.4.4.1 | Sequences used in this study. Accession numbers for all sequences included in this evolutionary analysis, from the Gene Bank database and organism from which they originate. | 71 |

LISTA DE FIGURAS

| | | Pag. |
|-----------------------|--|------|
| Figura 1.1.1 | Acanelamiento en frutos de banano cv Enano Gigante | 6 |
| Figura 1.2.1 | Modelo del daño ocasionado por las bajas temperaturas. Modelo propuesto por Lyons (1973) del daño a la membrana lipídica por exposición a las bajas temperaturas | 7 |
| Figura 1.2.2 | Esquema del balance de ROS, Señalización y defensa, tomado de Susuki y Mittler, 2006 | 9 |
| Figura 1.2.3 | Modelo de señalización del daño por bajas temperaturas | 12 |
| Figura 1.2.4 | Esquema de señalización de los factores de transcripción y de los sitios de unión de estos al ADN en la respuesta al daño por bajas temperaturas. | 15 |
| Figura 1.3.1 | Representación esquemática de la técnica de Despliegue diferencial | 18 |
| Figura 1.4.1 | Clasificación taxonómica de banano | 20 |
| Figura 1.5.1 | Uso integral de los banano y plátanos; manufactura de postres, harinas y cereales con el fruto y manufactura de artesanías con la planta (hojas y tallos) | 21 |
| Figura 1.5.2 | Regiones bananeras en México | 22 |
| Figura 1.6.1 | Diferencias entre frutos climatericos (inciso A) y No-Climaterico (inciso B). En las diferentes etapas de crecimiento de los frutos, podemos observar el pico característico de los frutos climatéricos entre la maduración organoléptica y la senescencia lo que no sucede en los frutos no climatericos. | 24 |
| Figura 1.6.2 | Esquematización de la comunicación celular por medio de las lectinas, ya sea célula-célula, célula-virus, célula-bacteria, célula-carbohidrato, etc. | 26 |
| Figure 2.4.1.1 | Temporal course of banana fruits submitted at 10 °C or 23 °C (room temperatura). The | 46 |

| | | |
|-----------------------|---|----|
| | chilling Injury symptoms appear after of 8 h to low temperature treatment; where the banana subepidermal tissues revealed dark-brown streaks due to this stress. | |
| Figura 2.4.1.2 | Total RNA isolated from pulp and peel of the banana fruits with (+) and without (-) low temperature. The banana fruits were incubated during 8 h at 10 °C. Nucleic acids were separated in 1 % no denaturin-agarose gel. | 47 |
| Figure 2.4.2.1 | Example of mRNA differential display from banana fruits. Banana fruits were incubated (+) or not incubated (-) during 8 h at 10 °C and the DNA fragments were separated in polyacrylamide gel and staining with nitrate silver. A) PCR product from banana pulp using differential primers HAP31 and HT11G. B) PCR product from banana peels using differential primers HAP25 and HT11G. | 48 |
| Figure 2.4.3.1 | Dot blot assay. Plasmids containing the indicated differential fragment cDNA were affixed to nylon membrane and hybridized with the first-strand cDNA of the low temperature-treated (+) and untreated (-) fruits. A) Differential recombinant fragment from banana peel. B) Differential recombinant fragment from banana pulp. | 50 |
| Figure 2.4.3.2 | Northern blot assay. Differential expression in banana fruits was determined by Northern blot analysis of total RNA from pulp and peel. Blots were hybridized whit probes purified of plasmid containing differentially expressed fragment (Cat-17-3C(catalase), Quit-2-1C (quitinase), Lec-20-1C (lectin), 22-5P (unknown) and 13-3P (unknown)), equivalence of RNA loading of the lanes was demonstrated by etidium bromide staining. | 51 |
| Figure 3.4.1.1 | Full length sequence of amino acid of | 65 |

| | | |
|--|---|----|
| <i>MacAT2</i> . The deduced amino acid sequence indicated the presence of a catalase activity motif (FARERIPERVVHARGAS) with a conserved Histine 65; and a catalase heme bind site (RVFAYGDTQ) which contains a conserved tyrosine 348 | | |
| Figure 3.4.2.1 | Differential accumulation of the <i>MaCat2</i> transcripts in banana fruits in response to low temperature. A) Chilling injury symptoms after of 8 hours to low temperature treatment in banana fruits using 10°C or 23°C (room temperature). B) Northern-blot analysis of total RNA from the banana peel or banana pulp treated at 10°C or 23°C. The blots were obtained and they were hybridized to <i>MaCat2</i> probe. C) Semiquantitative RT-PCR using specific primers for the <i>MaCat 2</i> gene. Banana fruits were treated at 10°C or 23°C. mRNA was extracted for each stress treatment and RT-PCR reaction was carried out. Specific primers for the 18S gene were used as control. D) Different stresses produce a differential accumulation of the <i>MaCat2</i> transcripts in banana fruits. Banana fruits were submitted at different stress and total RNA was isolated from each treatment; and they were blotted onto a nylon membrane and hybridized with the <i>MaCat2</i> probe. C) Banana fruits without treatment; M) Maturation process; MD) Mechanic damage and HT) Heat temperature. | 67 |
| Figure 3.4.2.2 | Northern-blot analysis of total RNA using different tissue of banana plant. A) Banana plants were treated at 10°C or 23°C. Total RNA was isolated from each treatment; and they were blotted onto a nylon membrane and hybridized with the <i>MaCat2</i> probe. C) Banana plants without treatment; L) Banana leaves; PS) banana pseudostem; CM) Corm; R) Banana roots. B) Semiquantitative RT-PCR | 68 |

using specific primers for the *MaCat 2* gene. Banana plants were treated at 10°C or 23°C. mRNA was extracted for each stress treatment and RT-PCR reaction was carried out. Specific primers for the 18S gene were used as control.

Figure 3.4.3.1 Southern analysis of *MaCat2* genes. Genomic DNA of banana plants were digested with EcoRI and, HindIII. Blots were hybridized with *MaCat2* probe. 69

Figure 3.4.4.1 Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of 91 plant catalases constructed by parsimony methods. 70

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------|---|
| CI | Chilling Injury |
| ROS | Reactive Oxygen Species |
| APX | Ascorbato peroxidasa |
| POD | Peroxidasa |
| RD | Dehidratation Regulated |
| COR | Cold Regulated genes |
| KIN | Salt inducible Kinase family |
| LTI | Low Temperature Induce proteins |
| DREB | Dehidratation Responsive Elements |
| CBF | C-binding Factor |
| CDPK | Ca Dependent protein kinase |
| MAPK | Mitogen Activated Protein kinase |
| HIK33 | Histidin cinasa de <i>Synechocystis</i> |
| PLD | Phospholipase D |
| PLC | Phospholipase D |
| PIP2 | Phosphatidil inositol biphosphate |
| IP3 | Phosphatidil inositol triphosphate |
| DAG | Diacilglicerol |
| ABA | Absicic Acid |
| GTP | Guanosine Triphosphate |
| GDP | Guanosine biphosphate |
| CALM-LD | Calmodulin like domain |
| ICE-1 | Inducer of CBF expresión 1 |
| CTR | CalciTonin Receptor proteins |
| MYC | Mielocytomatosis oncogene Cells |
| HSP | Heat Shock Protein |
| PPO | PolyPhenol Oxidase |
| PAL | Phenyl Ammonia Lyase |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| AA | <i>Musa Acuminata</i> |
| BB | <i>Musa Balbisiana</i> |
| TON | Toneladas |
| HA | Hectáreas |
| H ₂ O ₂ | Hydrogen Peroxide |
| OH ⁻ | Radical hidroxilo |
| H ₂ O | Agua |
| DD | Differential Display |

RESUMEN

Los banano y plátanos son cultivos muy importantes a nivel nacional e internacional por su amplio consumo en la dieta del hombre; como todos los cultivos los frutos son atacados por diversas plagas y enfermedades fisiológicas tanto a nivel de precosecha como poscosecha, así mismo los frutos son susceptibles a los cambios de temperatura, especialmente las bajas temperaturas, estas le ocasionan un padecimiento conocido como daño por bajas temperaturas (Chilling Injury, CI), este padecimiento se caracteriza por disminuir la calidad de la fruta, aunado a esto los frutos pierden su valor comercial así como sus principales propiedades organolépticas y visuales dando como resultado una disminución en las ganancias de los productores y comerciantes. En el presente trabajo se estudió la expresión génica de frutos de banano expuestos a baja temperaturas. Utilizando la técnica de despliegue diferencial logramos obtener 105 fragmentos que se encienden o aumentan su expresión a baja temperatura en frutos de banano cv "Enano Gigante", los fragmentos 20-1C (Lectina), 2-1C (Quitinasa) y 17-3C (*MaCat2*, catalasa) fueron los más sobresalientes en el análisis realizado, dichos fragmentos mostraron su expresión a baja temperatura. Por otro lado la secuencia mostró homología con una catalasa tipo II de *Zantedeschia aethiopica* Cat2, localizándose ambas secuencias en el mismo clado filogenético. Los análisis de expresión realizados a *MaCat2* en frutos de banano que fueron sometidos a 10 °C, y no, a nivel de raíces de plantas de banano en respuesta. Por otro lado se pudo identificar dos copias de este gen en el genoma de banano cv "Enano Gigante". Los datos encontrados en este trabajo sugieren un cambio en la expresión génica de frutos de banano sometidos a bajas temperaturas. Estos frutos responden al estrés por baja temperatura activando la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo, la maduración y comunicación celular, así como moléculas anticongelantes y de respuesta al estrés abiótico, lo que deja en evidencia un entrecruzamiento (CrossTalk) entre las diferentes vías de señalización y respuesta de las plantas ante cualquier estrés.

SUMMARY

Bananas and Plantain are very important crop national and international for their Wide consumption in the man's diet; as all crops, bananas are attacked by different pathogens and physiologic damage at pre- and post harvest, likewise bananas are susceptible to the changes of temperature especially to low temperatures, these damage as called Chilling Injury (CI), this damage decrease the quality of the fruit and these lose commercial values as well as their main organoleptic and visual properties and decrease earnings of producers. In this work were study genetic expression banana fruits exposed to low temperatures. Using Differential display were obtain 105 fragments that turn-on or increase expression al low temperature in banana fruits "Grand Nain"; fragments 20-1C (Lectin), 2-1C (Chitinase) and 17-3C (*MaCat2*, Catalase) they were important fot this study, this fragments showed up regulated to low temperature. On the other hand the sequence 17-3C showed homology with a catalasa tipe II of *Zantedeschia aethiopica* Cat2, both sequences located in same Phylogenetic clade. Expression analysis suggest that *MaCat2* up regulated to low temperature and mechanical damage, this differential expression of *MaCat2* you also presents in leaves of banana plants exposed to 10 °C, and not in banana roots in response to low temperature. On the other hand were identifying two copies of this gene in Banana genome. The data found in this work suggest a change in genetic expression of banana fruits exposed to low temperatures. These fruits response to low temperature turn on genes related with oxidative stress, maturation and cellular communication, as well as antifreeze molecules and pathogens attack, this results show Crosstalk between signaling and response of plants to stress.

INTRODUCCIÓN

El banano y el plátano se cultivan en aproximadamente 120 países y ocupan 10 millones de hectáreas, que producen anualmente 95 millones de toneladas métricas del fruto (INIBAP, 2006). Por su alto valor nutritivo y su agradable sabor los bananos y plátanos representan el alimento básico para casi 500 millones de personas en el mundo (INIBAP, 2006). Latinoamérica y el Caribe aportan un tercio de la producción mundial; México produce el 4.1 % de este tercio, (INIBAP, 2001). En México se cultivan 80, 996 ha de banano y se reporta una producción anual de 2 051 218 toneladas (SIAP, 2005), lo que representa una fuente importante de ingresos para los pequeños productores rurales en los estados de Chiapas, Tabasco, Colima, Nayarit, Veracruz, Jalisco, Oaxaca, Michoacán y Guerrero (Orozco-Santos *et al.*, 2001).

El banano y el plátano (*Musa spp.*) son plantas herbáceas, monocotiledóneas, de vida perenne y pertenecen a la familia *Musaceae*, originaria del sureste del Asia. Se caracterizan por ser poliploides. Las principales variedades utilizadas de manera comercial en los mercados mexicanos son: las variedades triploides "Enano Gigante" y Valery (subgrupos Cavendish, AAA), Plátano Macho o Falso Cuerno y Dominico (subgrupos Plantain, AAB), plátano Manzano o Silk (AAB), Pera o Cuadrado (ABB) y la variedad diploide Dátil (AA) (Orozco-Santos *et al.*, 2001). A nivel mundial las plantaciones de banano y plátano son atacadas por diversos factores bióticos (FB, patógenos) y abióticos (FA, agua, luz, salinidad, temperaturas extremas), los cuales causan una disminución en la producción y rendimiento de la fruta. En México se pierden aproximadamente 4,500 ha anualmente de las cuales aproximadamente el 20 % de la producción se pierde debido a los descensos de temperatura a los que son sometidos los frutos de banano (INEGI, 2005).

Las temperaturas extremas son un factor que día a día afecta a todos los cultivos tropicales y subtropicales en el mundo. Dado que las plantas son poiquilotermas, las bajas temperaturas son un factor crítico en la distribución de las comunidades vegetales y en el crecimiento de cultivos importantes, como la soya, el banano y el maíz (Kratsch y Wise 2000). En general, los cultivos de origen tropical o subtropical (ej. tomate, maíz, soja, banano) presentan susceptibilidad al estrés por bajas temperaturas. Los efectos de las bajas temperaturas en las

plantas incluyen cambios en la bioquímica y biofísica de las membranas, en la síntesis proteica, modificaciones conformativas en enzimas, en la ultraestructura de mitocondrias y cloroplastos (Kratsch y Wise 2000) y en los metabolismos fotosintético y respiratorio (Nilsen y Orcutt 1996) además de la disminución del crecimiento y alteraciones en el desarrollo (Allen y Ort 2001). Es importante destacar que el estrés por bajas temperaturas es un síndrome complejo y difícilmente puede ser separado completamente de otros tipos de estrés, es frecuente observar déficit hídrico asociado a las bajas temperaturas. Este fenómeno puede tener diversas causas, entre otras, la disminución de la conductividad hidráulica de las raíces y alteraciones en el grado de control estomático (Allen y Orr 2001) conduciendo a un desbalance entre captación de agua y transpiración. La variabilidad en el grado del daño también puede observarse a nivel celular, donde unos componentes son mas dañados que otros. Se ha señalado que los cloroplastos parecen ser los organelos más sensibles a las bajas temperaturas (Nilsen y Orcutt 1996). Del daño por bajas temperaturas a nivel de fruto aun se sabe poco por lo que este trabajo decidimos estudiar frutos de banano cv Enano Gigante expuestos a bajas temperaturas.

BIBLIOGRAFIA

Allen D. J. D. R. Ort 2001 Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends in Plant Science* 6: 36-42.

INEGI. Instituto Nacional de Información Geografica e Informatica. <http://www.inegi.gob.mx/inegi/default.aspx> [28/agosto/2005].

INIBAP, International Network for the Improvement of Banana and Plantain. <http://www.inibap.org/index.php?lang=en&langue=EN> [14/enero/2006, 10/marzo/2001].

Kratsch, H.A. and R.R. Wise. 2000. The ultrastructure of chilling stress. *Plant, Cell & Environment* 23: 337-350.

Nilsen, E. and Orcutt, D. 1996. The physiology of plants under stress. John Wiley & Sons, Inc. United States of America. ISBN 0471031526.

Orozco-Santos, M., Farias-Larios J., Manzo-Sanchez G. y Guzman-Gonzalez S., 2001. Infomusa 10 (1):33-37.

SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesca. http://www_siap.gob.mx/ [25/febrero/2005].

CAPITULO I. Antecedentes

1.1 ESTRÉS ABIÓTICO Y DAÑO POR DESCENSO DE TEMPERATURA (CHILLIG INJURY)

Las plantas constantemente están expuestas a diferentes tipos de estreses bióticos y abióticos, en el primero están incluidos todos los patógenos tales como virus, bacterias, viroides, etc. y en el segundo están comprendidos todos los factores ambientales y condiciones edafológicas; entre los factores ambientales se encuentran las temperaturas altas y bajas, la sequía e inundaciones; entre las condiciones edafológicas se encuentran el pH del suelo, salinidad, la contaminación por metales, etc.

Estos tipos de estrés ocasionan en las plantas respuestas inmediatas mediante moléculas que se comunican entre ellas (también llamada señales de transducción), causando cambios en la expresión genética; las cuales alteran diversas rutas bioquímicas y fisiológicas que le permiten a algunas de éstas adaptarse a su medio ambiente.

La inadaptación fisiológica de las plantas produce grandes pérdidas a los productores y a los comerciantes. A la fecha el conocimiento que se tiene sobre las respuestas que se producen a causa de este estrés abiótico son limitadas (Ortiz-Vega R et al., 2001).

El daño por bajas temperaturas, abreviado por sus siglas en inglés CI (chilling injury) es un daño fisiológico permanente e irreversible de tejidos de plantas o frutos, células u órganos, que es el resultado de una exposición a temperaturas entre 8-15 °C dependiendo del cultivar que se trate; este padecimiento afecta a numerosos cultivos ocasionando pérdidas numerosas a nivel de producción del fruto. Entre estos cultivos afectados podemos mencionar a la calabaza, el chayote, la toronja, la papaya, el tomate, los bananos, entre muchos otros, (USDA, 2004); la intensidad del daño por el CI depende del tiempo de exposición, continua o intermitente, a dichas temperaturas no óptimas de crecimiento, de la humedad relativa, de la edad fisiológica, de la sensibilidad relativa de la fruta y de las condiciones de cultivo y crecimiento (Skog, 1998).

Los frutos que son afectados por el CI, inicialmente presentan pequeñas lesiones como cierta decoloración y pequeñas manchas en el epicarpio (llamada coloquialmente como cáscara) y mesocarpo

(llamada coloquialmente como pulpa); las cuales gradualmente se van engrandando hasta observarse la cáscara del fruto totalmente ennegrecido y café en lo que respecta la pulpa, acompañado de un ablandamiento de las mismas.

Los bananos y plátanos son plantas tropicales que son afectados por las bajas temperaturas a nivel de pre y post-cosecha ocasionándole diversas afectaciones fisiológicas. A nivel de pre-cosecha en los meses correspondientes al periodo de invierno, en las plantaciones las temperaturas pueden descender a 10 °C o menos, (SAGARPA, 2002) lo que ocasiona que las plantas pierdan su actividad vegetativa, sufran daños a nivel de membrana, etc; ocasionando la susceptibilidad de los cultivos a ser atacados por patógenos oportunistas. Los frutos también son afectados y muestran ciertos desordenes fisiológicos como por ejemplo, la maduración irregular y cambios en su coloración también llamado “acanelamiento”, ocasionados por la exposición a bajas temperaturas entre los 10-14 °C (Figura 1.1.1).

Este padecimiento fisiológico de los frutos también puede aparecer a nivel de post-cosecha cuando los frutos son transportados o almacenados en cámaras con temperaturas por debajo de los 14 °C.

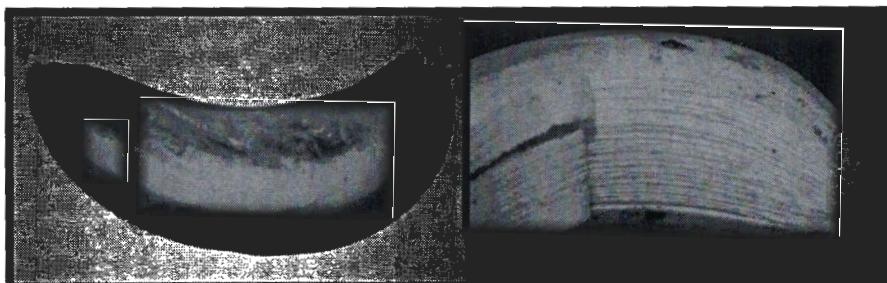


Figura 1.1.1. Acanelamiento en frutos de banano cv Enano Gigante.

1.2 TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN RESPUESTA A BAJAS TEMPERATURAS

Las temperaturas extremas son factores limitantes para la sobrevivencia y desarrollo de las plantas. Cuando un fruto o una planta son sometidos a bajas temperaturas (temperaturas que no llegan hasta estados de congelamiento) la primera se estructuras celulares que

reciben el daño es la membrana celular. Como sabemos la membrana celular o plasmática se define generalmente como una envoltura continua que separa el interior de la célula del exterior. Por lo que entre las funciones principales de la membrana son de dar estructura, protección, y la regulación del paso de sustancias, tanto al interior de la célula como al exterior; por lo que necesita de cierta fluidez para su buen funcionamiento. Cuando la planta o sus frutos se someten a un estrés causado por las bajas temperaturas la fluidez de la membrana disminuye, debido a la transición de un estado líquido a un estado de gel. Lyons (1973) menciona que las colas de acilo de los fosfolípidos membranales perciben las bajas temperaturas modificando su estado, y por lo tanto una disminución en su cinética y densidad. Esta disminución en su cinética y densidad impide el funcionamiento integral de la membrana y proteínas contenida en ella, dando como resultado una pérdida en la efectividad de la membrana como barrera semipermeable; que a su vez esta última se ve reflejada en una serie de eventos secundarios como son, la pérdida de turgencia, derrame de solutos citoplasmáticos, pérdida de energía metabólica, degradación de los fotosistemas, autolisis y muerte celular (Figura 1.2.1) (Lyons, 1973, Sharom *et al.*, 1994).

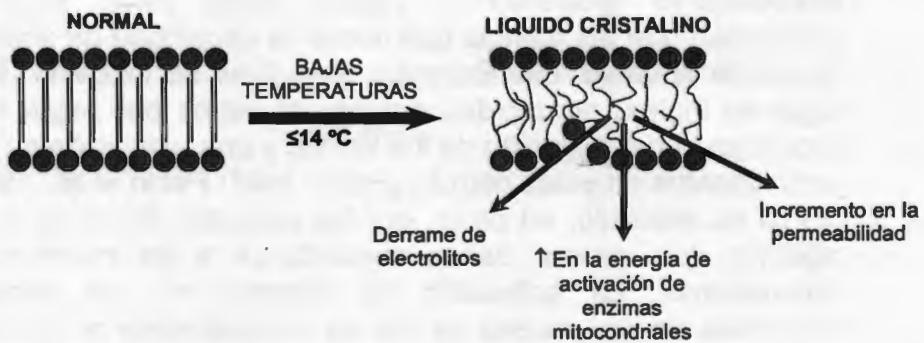


Figura 1.2.1. Modelo del daño ocasionado por las bajas temperaturas. Modelo propuesto por Lyons (1973) del daño a la membrana lipídica por exposición a las bajas temperaturas.

Datos experimentales más recientes mostrados por Sharom *et al.*, (1994) sugieren que el cambio de la naturaleza de los lípidos de la membrana es un reflejo de un cambio bioquímico en la bicapa lipídica,

la cual puede deberse a la activación del catabolismo de los fosfolípidos causando la generación de ácidos grasos libres en la membrana, los cuales se acumulan y provocan el cambio de fase líquido cristalino a fase de gel en las membranas. En la actualidad se ha demostrado que el contenido de ácidos grasos polinsaturados en la membrana celular, permite que las plantas adquieran cierta tolerancia a la presencia de bajas temperaturas (Michinaka *et al.*, 2003; Heppard *et al.*, 1996; Cahoon *et al.*, 1997; Gibson *et al.*, 1994; Miquel *et al.*, 1993; Murata *et al.*, 1997; Yabad *et al.*, 1993); estas insaturaciones se producen por la catálisis de las enzimas desaturadas. Miquel *et al.* (1993) encontraron estudiando una mutante de *Arabidopsis* que no expresa el gen que codifica para una desaturasa denominada *fad2-2*, que el contenido bajo de ácidos grasos polinsaturados en la membrana causa una inhibición en el crecimiento de la planta a 12 °C, así mismo Gibson *et al.* (1994) demostraron que el gen *fad8* que codifican para una desaturasa en *Arabidopsis thaliana*, incrementa su actividad ω-3 desaturasa a bajas temperaturas (figura 1.2.3).

Otras evidencias experimentales indican que las temperaturas extremas impiden la utilización del poder reductor durante la fotosíntesis y por ende, promueven el estrés fotooxidativo. Se ha demostrado que los tilacoides de plantas sensibles a bajas temperaturas producen el radical súper oxido (O_2^-) en mayor proporción que las plantas que tienen la capacidad de aclimatarse a un ambiente adverso. Las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) producidas durante el estrés por bajas temperaturas provocan la peroxidación de los lípidos y una alteración en los sistemas antioxidantes de estas plantas (Polle, 1997; Pakin *et al.*, 1989).

El CI es mediado, en parte, por los radicales libres de oxígeno como agentes que causan daños secundarios a las membranas y a los fotosistemas. La activación de oxígeno por los fotosistemas en presencia de un exceso de luz es posiblemente el principal sitio de producción de radicales libres en hojas; existe evidencia experimental que indica que la mitocondria es la principal fuente de superóxidos en tejidos de plantas sensibles a bajas temperaturas (Purvis *et al.*, 1995). Como se mencionó las ROS causan daño a nivel membranal y proteínico (Susuki y Mittler, 2006). Estas ROS actúan también como moléculas de señalización, por lo que se requiere la existencia de un balance de generación de ROS en la célula; en la Figura 1.2.2

podemos observar un modelo de actividad de las ROS propuesto por Susuki y Mittler (2006) en donde se esquematiza de que manera se puede estar dando este balance de las ROS. De igual manera se ha reportado un aumento en la actividad enzimática de la Peroxidasa (POD) cuando frutos de mandarina son expuestos a bajas temperaturas lo que sugiere que esta enzima actúa como destoxicificante de las ROS cuando los frutos sufren daño por las bajas temperaturas (El-hilali *et al.*, 2002). Así mismo en el año 2001 Sato *et al.*, reportaron que el incremento de la ascorbato peroxidasa (APX) en semillas de arroz (*Oriza sativa sp.*) protege a las semillas del CI.

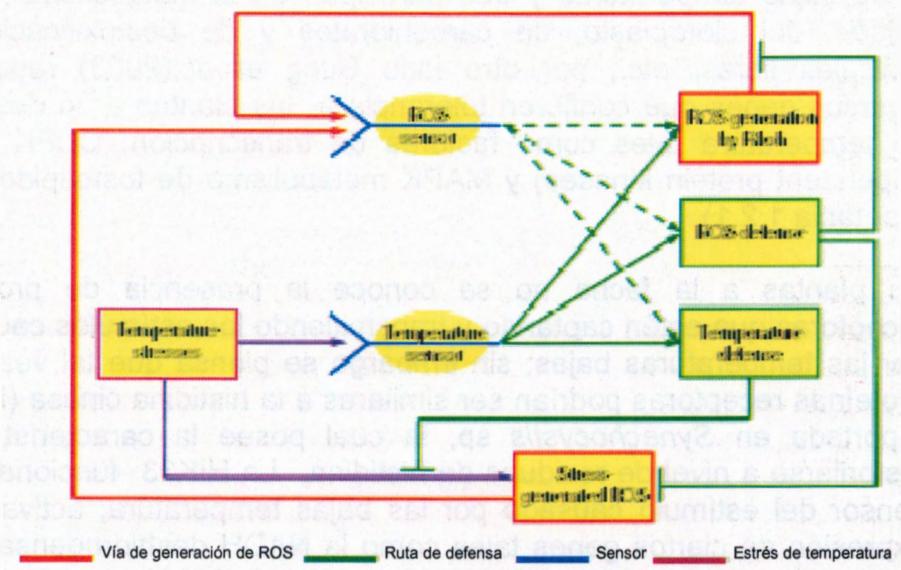


Figura 1.2.2. Esquema de balance de ROS. Señalización y defensa, tomado de Susuki y Mittler, 2006.

En la actualidad a nivel genético, existe poca información de genes que se induzcan en respuesta al estrés por bajas temperaturas, y por consiguiente al daño causado por el CI. Algunos de estos genes que codifican para diferentes proteínas, actúan como moléculas de señalización. Estos genes se inducen tempranamente o tardíamente, por lo que se les denomina genes de respuesta temprana o genes de respuesta tardía. Los genes de respuesta tardía se activan lentamente (horas), por lo cual su expresión es sostenida durante el tiempo que la planta es expuesta al estrés, como ejemplos podemos mencionar a los

genes RD, COR, KIN y LT1; mientras que los genes de respuesta temprana, a menudo su expresión es transitoria (como ejemplos podemos mencionar a factores de transcripción tales como DREBs y CBF (Puebla y Del Viso, 2004) (Figura 1.2.4.).

En cuanto a los genes de respuesta temprana podemos mencionar los trabajos realizados por Sung *et al.* (2003) y Provart *et al.* (2003), en donde estos autores reportan diversos genes que codifican para una gran gama de factores de transcripción que confieren tolerancia a las plantas a un descenso de temperatura y sequía (ver tabla 1.2.1). Provart *et al.*, (2003), encontraron 634 diferentes genes que responden a las bajas temperaturas y que participan en el metabolismo de los lípidos, del cloroplasto, de carbohidratos y de destoxicación de radicales libres, etc., por otro lado Sung *et al.*, (2003) reportaron diversos genes que confieren tolerancia a las plantas a un descenso de temperatura tales como factores de transcripción, CDPK (Ca^{+2} -dependent protein kinases) y MAPK metabolismo de fosfolípidos, etc. (ver tabla 1.2.1).

En plantas a la fecha no se conoce la presencia de proteínas receptoras que estén captando y transmitiendo los estímulos causados por las temperaturas bajas; sin embargo se piensa que tal vez estas proteínas receptoras podrían ser similares a la histidina cinasa (HIK33) reportada en *Synechocystis* sp, la cual posee la característica de fosforilarse a nivel de residuos de histidina. La HIK33 funciona como sensor del estímulo causado por las bajas temperaturas, activando la expresión de ciertos genes tales como la NADH deshidrogenasa, ARN helicasa dependiente de ATP, etc. (Susuki *et al.*, 2000).

Así mismo se sabe que al someter plantas a CI se activan varias moléculas de señalización asociadas a la membrana como son, la fosfolipasa D y C (PLD y PLC respectivamente), proteínas G heterotrimericas y proteínas cinasas. Ruelland *et al.* (2002) demostraron que PLD y PLC están involucradas en la respuesta de plantas a bajas temperaturas; PLD hidroliza fosfatidil colina para liberar ácido fosfatídico y colina, este ácido fosfatídico posiblemente actúa indirectamente como un ionoforo de canales de Ca^{+2} (Buchanan *et al.*, 2000, Munnik *et al.*, 1998); por su parte PLC utiliza el fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂) de la membrana como sustrato dando lugar a dos

productos, inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG), los cuales sirven como segundos mensajeros (Figura 1.2.3) para encender las vías de señalización del estrés y activar a genes de respuesta al estrés. Xiong *et al* (2001), encontraron en que al haber un aumento en la concentración de IP_3 , en mutantes de *Arabidopsis thaliana* para el gen que codifica para la inositol polifosfato-1-fosfatasa, se vuelven más susceptibles a ABA, frió y sal; este resultado sugiere que el IP_3 juega un papel importante en la cascada de señalización para estos estreses. Por otra parte en células guarda, existen evidencias experimentales que indican que en presencia de ABA se activan ciertas proteínas G heterotriméricas (Wang *et al.*, 2001). Las proteína G se compone de tres subunidades (α β y γ). La subunidad α presenta un sitio altamente afin a los nucleótidos de guanosina y se activa por la unión del trifosfato de guanosina (GTP), como consecuencia del cambio conformacional producido en la proteína por la interacción del receptor al ser estimulado por su ligando. En este cambio conformacional el difosfato de guanosina (GDP) es sustituido por GTP, y la subunidad α se disocia de las subunidades β y γ ; las que a su vez durante esta disociación de la subunidad α se agregan formando un dímero muy estable. La subunidad α en su estado activo presenta una alta afinidad por el efector. Posteriormente a este evento, el GTP es hidrolizado a GDP, por la actividad intrínseca de GTPasa que presenta esta subunidad. Esta hidrólisis permite una reasociación del heterotímero al incrementar la afinidad de la subunidad α por β y γ (Conkling y Bourne, 1993). Una vez que se activan las moléculas ante señaladas, empieza haber una amplificación de la señal a través de ciertas proteínas con actividad de cinasa.

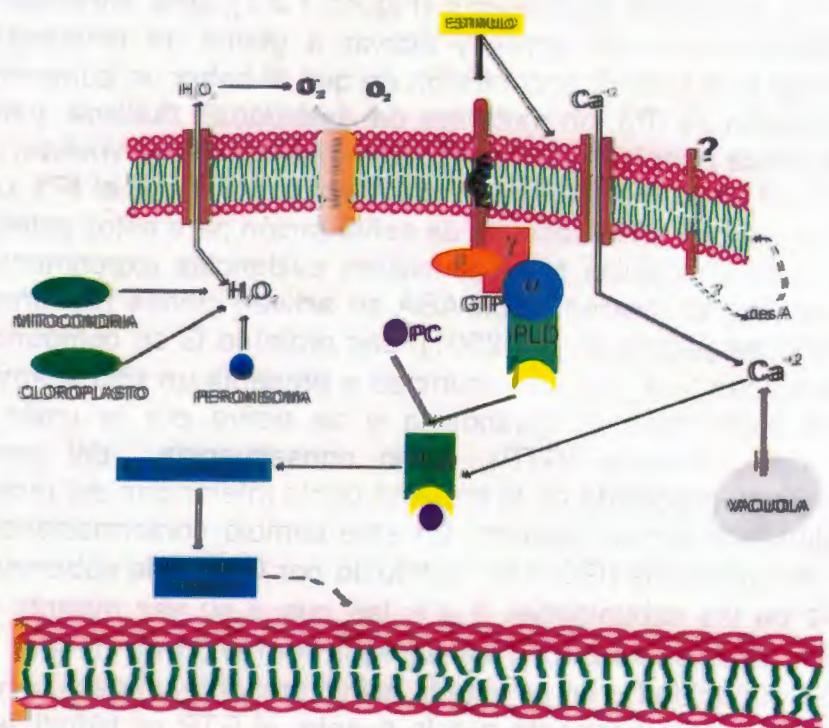


Figura 1.2.3. Modelo de señalización del daño por bajas temperaturas.

Las MAPK en general pueden ser activadas por varios factores abióticos como son las bajas temperaturas, el estrés oxidativo, el daño mecánico, alta salinidad, etc. (Ichimura *et al.*, 2000, Mikolajczyk *et al.*, 2000, Bögre *et al.*, 1997). Durante los últimos años se han identificado diferentes proteínas cinasas activadas por mitogenos (MAPK) que confieren tolerancia a las plantas a diversos estreses abióticos (ver tabla 1.2.1.) (Urao *et al.*, 1994; Saijo *et al.*, 2000; Ichimura *et al.*, 2000; Yuasa *et al.* 2001; Xiong y Yang, 2003). Estas proteínas, se activan por fosforilación, ya sea a nivel de residuos de treonina y tirosina. Estas proteínas al ser activadas por fosforilación posiblemente activarían posteriormente a diferentes factores de transcripción involucrados en la respuesta causada por un estrés por temperaturas extremas.

Por otra parte la rigidez de la membrana plasmática causada por un descenso de temperatura provoca un rearrreglo en la estructura del citoesqueleto, lo cual puede llevar a la activación de los canales de

Ca^{+2} , aumentando la liberación y concentración intracelular de calcio (Orvar *et al.*, 2000, Sangwan *et al.*, 2001). Este ion divalente al cambiar sus concentraciones citoplasmáticas puede activar a las proteínas cinasas dependiente de calcio (CDPK) las cuales a su vez pueden activar genes nucleares (Zhang y Klessig, 2001). Las CDPK poseen una estructura similar a las proteínas cinasas dependientes de calcio/calmodulina presentes en sistemas animales. Estas CDPKs tienen un dominio regulador capaz de unir calcio denominado CAM-LD (dominio similar a la calmodulina), un dominio catalítico y una secuencia situada en el extremo amino terminal que varía en tamaño. Entre el dominio regulador y el dominio CAM-LD, se encuentra una secuencia compuesta de aproximadamente 31 aminoácidos denominada dominio de unión. Se ha observado que el dominio de unión tiene una función autoinhibitoria. En ausencia de calcio este dominio interactúa intramolecularmente con el dominio catalítico de la enzima (Huang *et al.*, 1996). De igual manera el cambio en las concentraciones intracelulares de Ca^{+2} pueden activar a las proteínas ICE1 (Inducer of CBF expresión 1). ICE1 es una proteína que funciona como un factor de transcripción tipo-MYC Helice-horquilla-helice (Helix-loop-helix) que se une a los elementos *cis* MYC en el promotor de los CBF (C-Binding Factor) y estos a su vez actúan sobre el promotor de los genes de respuesta al estrés los cuales contienen elementos CBF y BREB (Dehydratation Responsive Element Binding factors) (Chinnusamy *et al.*, 2003). En la actualidad se ha demostrado que los factores de transcripción conocidos como CBFs y DREBs, regulan la expresión de los genes COR en ausencia de ABA (Liu *et al.*, 1998). Datos experimentales indican que los genes CBF/DREB1 son inducidos transitoriamente por frió y que la activación de estos conlleva a la inducción y amplificación de otros genes que poseen elementos-*cis* DRE/CRT (Thomashow, 1999). Evidencias moleculares indican que el mecanismo de señalización vía CBF (CBF1/DREB1B, CBF2/DREB1C, CBF3/DREB1A) parece ser conservada en diferentes especies de plantas, como *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, trigo, arroz y tomate (Jaglo *et al.*, 2001, Hsieh *et al.*, 2002, Kasuga *et al.*, 2004, Pellegrineschi *et al.*, 2004, Oh *et al.*, 2005); Lee *et al.* (2001), encontraron que los genes HOS1 (*high expression of osmotically responsive genes*) poseen la capacidad de regular la expresión de los genes CBF1 y CBF2, los cuales regulan negativamente los genes COR. Estos autores encontraron que el gen HOS1 codifica para una

proteína que posee un dominio de dedos de Zn (ring finger protein). Este dominio de dedos de Zn posiblemente sirve de unión a un complejo de enzimas que se conjugan a ubiquitina E3, lo cual sugiere que participan en la degradación de proteínas como CBF 2 y 3. Por otra parte, Chinnusamy *et al* (2003), encontraron que la proteína ICE (Inducer of CBF Expresión 1) es activador transcripcional de los genes CBFs. ICE1 codifica para un factor de transcripción helix-loop-helix básico similar a MYC; este factor de transcripción se une a la secuencia de reconocimiento MYC activando al promotor CBF3. Muchos de estos genes que se mencionaron, actualmente se piensan que están actuando de igual manera en rutas de señalización activadas por estrés a frio o estrés hídrico. Por lo que se piensa que estos elementos o genes posiblemente sean sitios de convergencia de señalización (cross-talk) (Chinnusamy *et al.*, 2003).

Entre los genes de respuesta tardía podemos mencionar a las proteínas de choque térmico (HSP), que funcionan como protectores de las células contra el daño térmico (Puebla y Del Viso, 2004) así mismo podemos mencionar a las enzimas PPO (Poly Phenol Oxidase) y PAL (Phenyl Ammonia Liase) (Goldman *et al.*, 1998, Gooding *et al.*, 2001, Nguyen *et al.*, 2003) entre muchas otras.

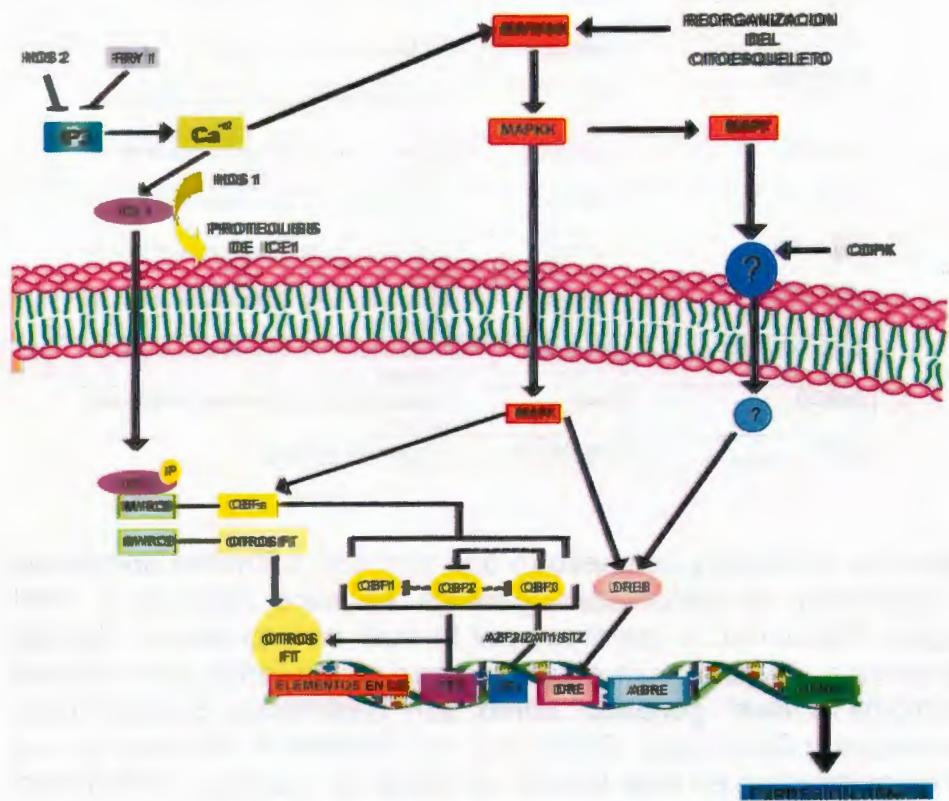


Figura 1.2.4. Esquema de señalización de los factores de transcripción y de los sitios de unión de estos al ADN en la respuesta al daño por bajas temperaturas.

Tabla 1.2.1. Genes reportados relacionados con la tolerancia a las bajas temperaturas, tomado de Sung *et al.*, 2003.

| GEN | PLANTA | FUNCIÓN |
|------------------------------|--------------------|--|
| SOCF-1 | <i>Arabidopsis</i> | Factor de transcripción |
| OsCDPK7 | Arroz | Transducción de señales |
| frs1 | <i>Arabidopsis</i> | Biosíntesis de ABA |
| Glutamina sintasa | Arroz | Metabolismo de aminoacidos |
| betA/betB | Tabaco | Biosíntesis de betaina |
| ALA1 | <i>Arabidopsis</i> | Metabolismo de fosfolipidos |
| Glicerol-3-P-acil trasferasa | Arroz | Metabolismo de fosfolipidos |
| Glicerol-3-P-acil trasferasa | Tabaco | Metabolismo de fosfolipidos |
| MnSOD | Maíz | Metabolismo de Especies reactivas de oxígeno |
| Catalasa | Tabaco | Metabolismo de Especies reactivas de oxígeno |
| Fe-SOD | Tabaco | Metabolismo de Especies reactivas de oxígeno |
| Cu/Zn-SOD | Tabaco | Metabolismo de Especies reactivas de oxígeno |
| GST,GPX | Tabaco | Metabolismo de Especies reactivas de oxígeno |
| SOD, GR, APX | Algodon | Metabolismo de Especies reactivas de oxígeno |
| FeSOD | Maíz | Metabolismo de Especies reactivas de oxígeno |
| CAX1 | <i>Arabidopsis</i> | Transporte de iones |

Los estudios anteriores demuestran que distintos cultivares sometidos a un descenso de temperatura provoca en ellos cambios a nivel fisiológico, bioquímico y genético; por lo cual es interesante abordar este problema utilizando diferentes técnicas moleculares para estudiar los cambios a nivel genético, como son Bibliotecas Substractivas, Microarreglos y Despliegue Diferencial por mencionar algunas. De las anteriores mencionadas, en este trabajo se utilizó el despliegue diferencial para identificar los genes que se expresan o se reprimen en el proceso fisiológico conocido como “acanelamiento” en frutos de banano cv. “Enano Gigante”.

1.3 DESPLIEGUE DIFERENCIAL

El despliegue diferencial es un método que fue desarrollado por Liang y Pardee (1992); este método ha sido utilizado durante los últimos quince

años para aislar e identificar rápidamente genes que se expresan diferencialmente bajo diferentes condiciones experimentales; esta técnica permite una comparación simultánea de genes que se expresan o se reprimen, con una pequeña cantidad del material crudo (Figura 1.3.1). En años pasados la técnica original fue muy criticada debido a la inespecificidad de los productos al momento de realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), por lo que actualmente se utilizan cebadores de una longitud mayor (cebadores de 16 bases en adelante) a los cebadores utilizados originalmente, con el fin de hacer más específicas las hibridaciones en la PCR y evitar los falsos positivos (Brenz Verca *et al.*, 1998); existen numerosos reportes de la utilización de esta técnica para la búsqueda de genes relacionados con diferentes estreses; En banano se está empleado esta técnica para estudiar el proceso de maduración (Manrique-Trujillo S. 2006). Originalmente esta técnica utiliza radiactividad para poder detectar los fragmentos amplificados, es bien sabido que la radiactividad es bastante sensible y logra cumplir con el objetivo, pero también se conoce el peligro y el costo que representa trabajar con ella, por lo que en los últimos años se han estado buscando otros métodos en los cuales no se utilice radiactividad para visualizar los fragmentos amplificados; un método propuesto es la tinción con nitrato de plata que la utilizan Deng *et al.*, en 1999 y Colmenarez *et al.*, en el 2000, éste método ha demostrado tener la suficiente sensibilidad para visualizar los fragmentos amplificados por PCR, su costo es relativamente bajo y una ventaja sobre la radiactividad es la facilidad para recuperar los fragmentos que resulten ser expresados diferencialmente, ya que se observan a simple vista.

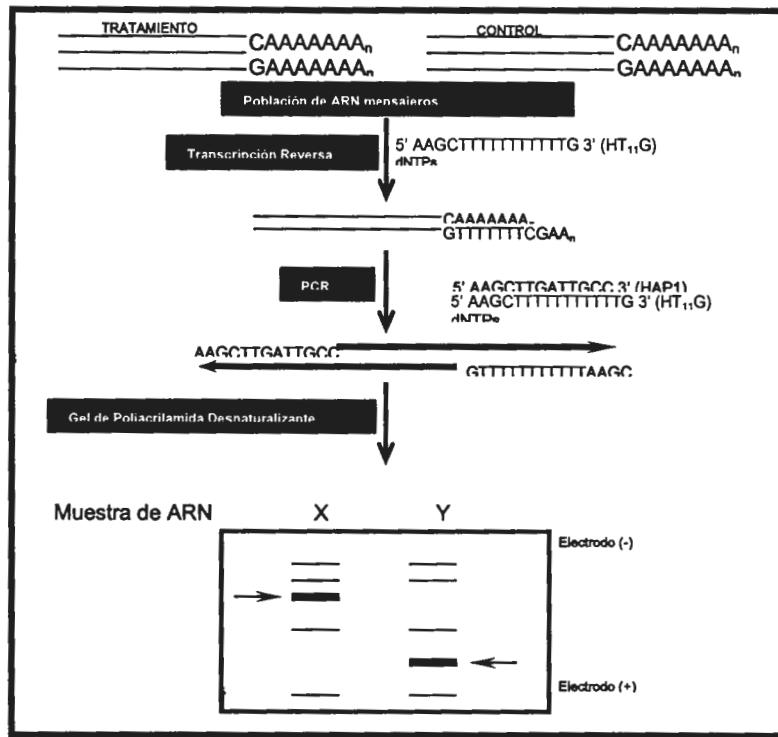


Figura 1.3.1. Representación esquemática de la técnica de Despliegue Diferencial

1.4 HISTORIA, ORIGEN Y TAXONOMÍA DE LOS PLÁTANOS Y BANANOS

Los bananos y plátanos son plantas herbáceas de la clase monocotiledóneas con pseudotallos aéreos (Soto-Ballesteros, 1985) que alcanzan una altura entre 3.5-7.5 m (May *et al.*, 1995), se originan de cormos carnosos de los cuales se desarrollan numerosas yemas laterales e hijos (Soto-Ballesteros, 1985), los racimos de frutos son extremadamente polimórficos; puede contener de 5 a 20 manos, cada uno con 2 o 20 frutos de 6 a 35 cm de largo y de 2.5 a 5 cm de diámetro aproximadamente, variando el tamaño del fruto en función del grupo genómico, número de hojas y área foliar; estos frutos son bayas con pericarpio; las variedades diploides poseen frutos que contienen una masa de semillas negras y duras rodeadas por una pulpa dulce la cual crece hasta que la fruta se orienta hacia abajo; en cultivares triploides la ausencia de semillas se debe a genes de esterilidad

femenina específica y a la carencia de polen debido a la ploidia (Crouch *et al.*, 1998). Los frutos de plátanos comestibles son partenocápicos, el color del fruto puede ser amarillo verdoso, amarillo rojizo o rojo; el color, sabor, aroma y tamaño puede variar según las condiciones del suelo, clima y labores de cultivo.

Los bananos pertenecen a la familia de las *Musaceae*, orden *Zingiberales*. Casi todas las bananas comestibles se originaron por hibridación entre dos variedades diploides, *Musa acuminata* colla (AA) y *M. balbisiana* colla (BB), las cuales tienen su origen en el sureste de Asia (Schoofs, 1997). El término *Musa acuminata* se emplea para las formas puras triploides (AAA) y diploides (AA) sin semilla de bananas de postres como "Pisang Mas" y "Enano Gigante"; mientras que en forma similar se denomina *Musa balbisiana* a las formas puras triploides (BBB) y diploides (BB) de plátano de cocina sin semilla como "Abuhon" (Robinson, 1996). Estos bananos se cruzaron y por reconstitución cromosómica en la meiosis dieron origen a los cultivares diploides, triploides y tetraploides. De todos los cultivares resultantes de las cruzas podemos mencionar como los de mayor importancia a los subgrupos "Cavendish", "Gros Michel" y "Figue Rose" que tienen genotipo AAA; al grupo AAB que comprende a "Figue pome" y por último al grupo ABB que posee los cultivares "Pelipia", "Saba" y "Bluggoe" (Figura 1.4.1).

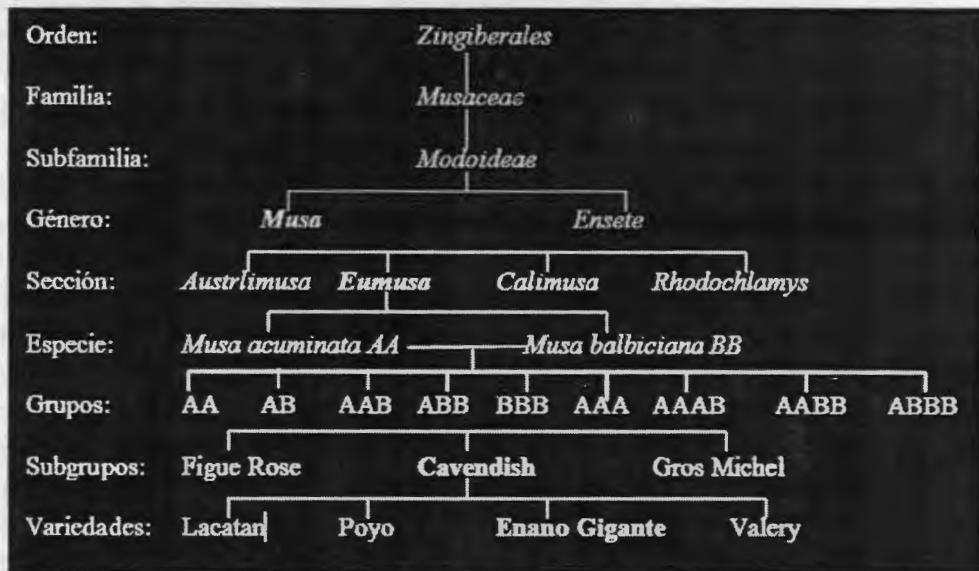


Figura 1.4.1. Clasificación taxonómica del banano

1.5 IMPORTANCIA DEL BANANO Y PLÁTANO

Los bananos derivados de *M. acuminata* por lo general son dulces y de fácil digestión, por lo que son consumidos maduros como postres, o inmaduros, cocidos. Los plátanos derivados de *M. balbisiana* tienen un contenido mayor en almidones por lo que su ingestión se hace un poco más difícil y se comen generalmente cocidos, fritos o asados. En cuanto al comercio mundial, los bananos y plátanos son de poca trascendencia, pero en cuanto al consumo doméstico, son de vital importancia sobre todo para países de la franja ecuatorial de África donde constituye el alimento principal de 70 millones de personas (Swennen *et al.*, 1995). La producción mundial de bananos y plátanos esta estimada de entre 96 a 98 millones de toneladas métricas, de esta manera el banano y el plátano son el cuarto alimento mas importante después del arroz, trigo y la leche (FAO, 2001), siendo de gran importancia ya que son una fuente importante de carbohidratos, vitaminas A, B y C, así como de potasio y calcio. Solamente una pequeña porción del total de la producción se emplea para la manufactura de alimentos procesados como son rebanadas de

banano seco, hojuelas, puré para bebés, harina de plátano, entre otros (Figura 1.5.1); Un uso secundario de estos es la obtención de fibras de uso textil, papel y hojas para envolver alimentos.

En México este cultivo tiene una superficie sembrada de 76,889 HA. en la cual se cosechan aproximadamente 18.275 TON/HA (SIAP, 2005), en nuestro país existen 3 grandes regiones productoras bananeras que son la del centro del pacífico que ocupa un 24.4 % del total de la superficie sembrada, formada por los estados de Nayarit, Colima y Michoacán; la región del pacífico sur formada por Chiapas con un 30.1 % del total de superficie sembrada y la región del golfo de México con un 42.6 % de la superficie sembrada y constituida por Veracruz, Oaxaca y Tabasco (Figura 1.5.2).



Figura 1.5.1. Uso integral de los bananos y plátanos; manufactura de postres, harinas y cereales con el fruto y manufactura de artesanías con la planta (hojas, tallos).

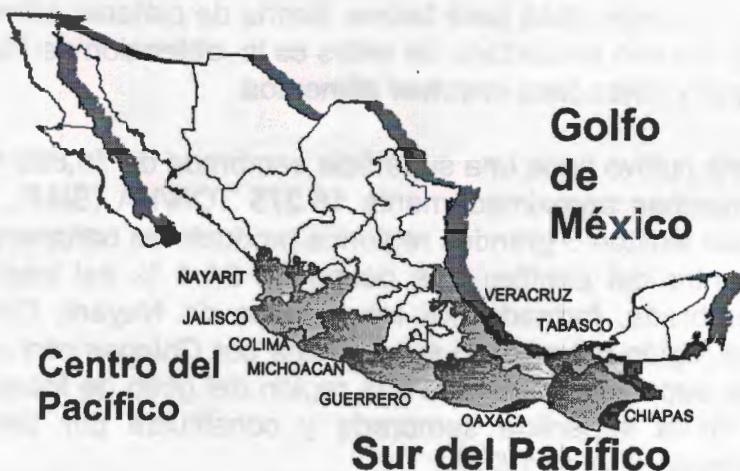


Figura 1.5.2. Regiones Bananeras en México (INEGI, 2001)

1.6 PROCESO DE MADURACIÓN DE BANANO Y SU RELACIÓN CON LA LECTINAS

En todas las frutas se pueden distinguir tres etapas fisiológicas; crecimiento, maduración y senescencia (Wills *et al.*, 1975), por lo cual a veces es difícil hacer una distinción precisa entre ellas. El crecimiento implica la división y desarrollo celular, que en conjunto generan el tamaño final del fruto; la duración puede dividirse en fisiológica y organoléptica. La maduración fisiológica suele iniciarse antes que termine el crecimiento, la maduración organoléptica, es el proceso en el cual las frutas adquieren las características de color, olor, textura, sabor entre otros factores que las definen como comestibles, esta comienza en las etapas finales de la maduración y constituye el inicio de la senescencia. Por otro lado la senescencia es el periodo en el cual los procesos anabólicos dan lugar a procesos catabólicos que conduce al envejecimiento y muerte del fruto (Baur y Woarkman, 1964; Wills *et al.*, 1984). En los frutos la etapa de crecimiento y la maduración fisiológica se tiene que llevar a cabo en la planta debido a los requerimientos nutricionales para el desarrollo del fruto, por otro lado la etapa de maduración organoleptica y la senescencia pueden tener lugar fuera de la planta debido a que el fruto en este momento es

capaz de seguir con sus procesos de maduración y senescencia por sí mismo.

En el proceso de maduración, el fruto sufre cambios fisiológicos y bioquímicos que le dan las propiedades y características de comestibles a los frutos. Los cambios fisiológicos más importantes son el aumento en la actividad respiratoria y los ritmos de producción de etileno. También hay maduración de las semillas, cambios en el color, abscisión, desarrollo de cera en la piel, entre otras (Pratt, 1975).

Estos cambios en la actividad respiratoria, son debidos a que durante la maduración organoléptica el fruto requiere de la síntesis de proteínas nuevas y ácidos nucleicos, así como nuevos pigmentos y componentes del sabor que son sintetizados a través del metabolismo secundario, estos procesos requieren de energía y son suministrados en el fruto por la respiración (Nelson y Cox, 2000).

El climaterio de los frutos, corresponde a un período de aumento en la actividad respiratoria asociada al final del proceso de maduración. Este período de respiración climatérica, es una fase de transición entre la maduración y la senescencia. Con base a esta premisa, los frutos pueden ser clasificados en climatéricos y no climatéricos, los primeros presentan un aumento característico de la actividad respiratoria durante la maduración, llamado climaterio respiratorio. Este aumento corresponde a la madurez óptima para el consumo; uno de estos sería el banano, el cual es un fruto climatérico. Los frutos no climatéricos, por el contrario, no muestran un incremento de la tasa respiratoria durante el proceso de maduración, sino una tasa respiratoria lenta durante la senescencia debido a la invasión microbiana y fungosa que conducirá a la descomposición del fruto (Nelson y Cox, 2000).

El incremento en la tasa respiratoria esta asociado con la síntesis de etileno, el cual puede aumentar antes del incremento de la actividad respiratoria o a veces en forma simultánea como sucede en el banano, y en otros casos ocurre después. El etileno dispara los procesos enzimáticos causantes de la mayor parte de los cambios bioquímicos, los cuáles afectan las propiedades organolépticas y físicas que marcan el comienzo del envejecimiento (Gómez, 1996). En los frutos climatéricos una vez que se haya producido cierta cantidad de etileno el proceso es irreversible, se producen cambios fisiológicos como

aumento en la permeabilidad de la membrana, síntesis de ácidos nucleicos y proteínas y un aumento en la actividad enzimática (Wills *et al.*, 1984) y solo ocurre una vez. Por el contrario, en los frutos no climatéricos puede ocurrir varias veces y esto se debe a la carencia de síntesis autocatalítica de etileno. Así mismo durante el proceso de maduración hay transformación de cloroplastos a cromoplastos ricos en carotenoides, producción de antocianinas y compuestos aromáticos (Seymour *et al.*, 1993; Cayón *et al.*, 2000).

El banano es una fruta climatérica al igual que el tomate, el aguacate y las fresas, por lo que tiene la característica de aumentar la producción de etileno y su tasa respiratoria (Figura 1.7.1) debido a que el fruto necesita de la síntesis de proteínas nuevas y ácidos nucleicos, así como nuevos pigmentos que le conferirán las características de sabor, color y textura de un fruto maduro (Pratt, 1975; Nelson y Cox 2000, Giovannoni, 2001).

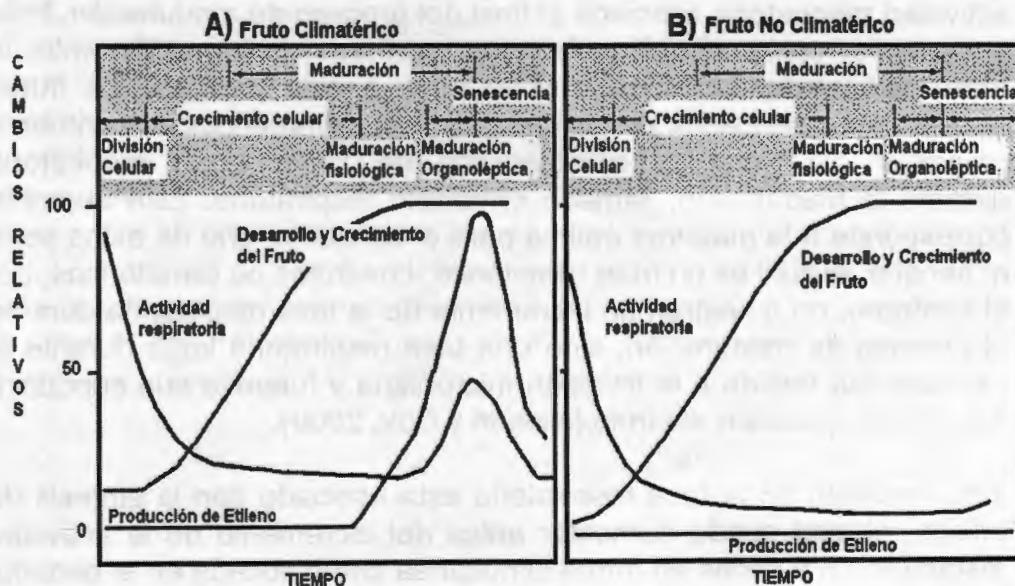


Figura 1.6.1 Diferencias entre Frutos Climatéricos (inciso A) y No-Climatérico (inciso B). En las diferentes etapas de crecimiento de los frutos, podemos observar el pico característico de los frutos climatéricos entre la maduración organoléptica y la senescencia, lo que no sucede en los frutos no climatéricos, tomado de Pratt, 1975.

En la maduración de banano los principales cambios son la degradación de la pared celular, incremento en el contenido de los sólidos solubles, la conversión de cloroplastos a cromoplastos y la conversión de almidón a azúcares (Smith, 1981). Los principales carbohidratos son los polisacáridos y disacáridos, cuya cantidad está relacionada directamente con la madurez fisiológica.

Clendennen y May (1997) estudiando el proceso de maduración de los frutos de banano demostraron la acumulación de lectinas en la pulpa de frutos de banano; en legumbres las lectinas juegan un papel en la señalización planta-patógeno y en la colonización de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno en los nódulos de las raíces (Sharon y Lis 1989; Kennedy *et al.*, 1995), así mismo se ha sugerido que las lectinas juegan un papel en el secuestro de las proteínas dentro de las vacuolas en tejidos vegetales (Spilatro *et al.*, 1996), por otro lado Zhang *et al.*, (2000) demostraron que lectinas relacionadas con la jacalina y que se unen a manosa son inducidas por estrés salino en plantas de arroz.

Las lectinas son una serie de proteínas divididas en siete familias, lectinas de legumbres, lectinas tipo 2 de inactivación de proteínas ribosomales, lectinas de unión a quitina, lectinas de unión a manosa, lectinas de unión a maltosa, lectinas relacionadas con la jacalina y lectinas relacionadas con la Calsepa (Pneumans *et al.*, 2002), estas moléculas tienen la capacidad de descifrar la información contenida en los carbohidratos, se mencionan como proteínas de unión a mono- y oligosacáridos específicamente y de manera reversible, no son enzimas, típicamente las lectinas tienen uno o más sitios de unión a carbohidratos (son divalentes o polivalentes). Se sabe que las lectinas se encuentran presentes en todos los organismos desde virus hasta animales, la importancia de estas moléculas radica en el reconocimiento y comunicación celular, como se ilustra en la Figura 1.7.2, donde podemos observar a las lectinas como moléculas de reconocimiento desde célula-célula hasta célula-patógeno.

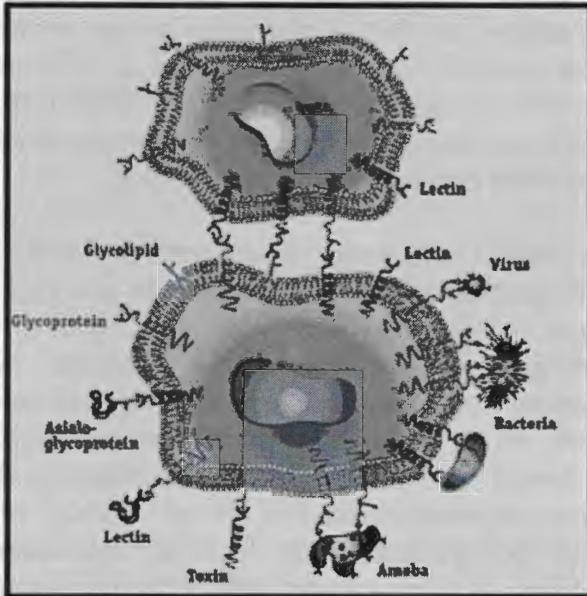


FIGURA 1.6.2. Esquematización de la comunicación celular por medio de las lectinas, ya sea célula-célula, célula-virus, célula-bacteria, célula-carbohidrato, etc. tomado de Fenton, 2006.

1.7 CATALASAS DE PLANTAS, FUNCIÓN Y ACTIVACIÓN EN ESTRESES ABIÓTICO

En las plantas la producción excesiva de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) como son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^-), es una característica intrínseca de un metabolismo estresado bajo varios estrés abióticos. Una eliminación inadecuada de las ROS lleva a un estrés oxidativo, lo que se caracteriza por reacciones nocivas sobre las proteínas, los lípidos y el ADN, lo que puede ocasionar un daño irreversible a las células.

Las catalasas (Hidroperoxidadas) son enzimas que convierten el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a oxígeno (O_2) y agua (H_2O), este tipo de enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, desde bacterias hasta animales y plantas superiores. Este tipo de enzimas se ha dividido en tres clases de acuerdo a su secuencia y a su estructura proteica; clase I catalasas monofuncionales, clase II catalasas que contienen un grupo heme y la clase III catalasas que contiene magnesio. En las plantas las catalasas juegan un papel importante en

la destoxicación del H₂O₂ de las células el cual se genera de manera normal en la fotorespiración y la β oxidación de los lípidos, sin embargo también pueden actuar como antioxidantes en la defensa, en respuesta a un estrés ambiental así como en un estrés oxidativo, en la actualidad se han obtenido mas de 300 secuencias de catalasas (Chelikani y Loewen, 2004).

Existen algunos reportes en los cuales se demuestra la expresión de catalasas bajo diferentes estreses abióticos, de igual manera se han hecho estudios en donde se sobre expresan hidroperoxidases con el fin de dar tolerancia a las bajas temperaturas, entre estos reportes podemos mencionar el trabajo de Matsumura *et al.*, (2002) los cuales sobre expresaron una catalasa en plantas de arroz, estos autores observaron que las plantas transgénicas lograban tolerar mejor temperaturas de 5°C, en contraste con las plantas de arroz silvestres. Así mismo Pastori *et al.*, 2000 reportan que cuando plantas de maíz son sometidas a bajas temperaturas la concentración de H₂O₂ aumenta, al mismo tiempo decrece la actividad de la catalasa lo que según ello explican se debe a que las plantas de maíz son sensibles al Cl.

1.8 JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

1.8.1 JUSTIFICACIÓN

Los bananos y plátanos son plantas tropicales afectadas por bajas temperaturas (14 °C o menos); en México en el periodo Diciembre-Febrero se han reportado temperaturas de hasta 8 °C en las regiones productoras (SMN, 2006), las cuales afectan estas plantas disminuyendo su tasa de crecimiento y aumentando su mortalidad. Por otro lado, los frutos que son expuestos a estos descensos de temperaturas presentan varios desordenes fisiológicos entre los que podemos mencionar un aumento en la producción de etileno, un daño a nivel membranal y la activación de ciertas enzimas oxidantes (Acanelamiento), disminuyendo de esta manera la producción y la vida de anaquel de dichos cultivos . Una manera de afrontar este daño por bajas temperaturas es colocar bolsas de plástico a los racimos de plátanos (Com. Per.) o aplicar fertilizantes a base de betaina que cubren las hojas y frutos, sin embargo, esto no resulta ser eficiente para evitar por completo el daño, aunado a la elevación de los costos de producción por la aplicación de estos productos.

En la actualidad en Honduras existen varios cultivares (híbridos FHIA) mejorados por genética tradicional resistentes a varias pestes y enfermedades de importancia económica, entre los que se encuentra a la sequía y las bajas temperaturas, sin embargo estos cultivares presentan la desventaja de tener un sabor no aceptado por los consumidores, por otro lado su vida de anaquel es muy corta lo que impide su exportación (FHIA, 2006).

Otra manera de solucionar este problema es tratar de obtener cultivares genéticamente modificados para aumentar la tolerancia al estrés; sin embargo primero se debe conocer los aspectos moleculares implicados en este padecimiento, para poder utilizar esta herramienta en el mejoramiento genético de los cultivares de banano.

Debido a la problemática que sufre este cultivo y el poco conocimiento acumulado hasta el momento en el estrés a bajas temperaturas en frutos de banano, en este trabajo se propone aislar y estudiar genes que se expresan o se reprimen, durante un estrés a bajas temperaturas, para poder entender parte del proceso molecular que ocurre en este padecimiento y en un futuro utilizar este conocimiento para la obtención de plantas tolerantes a un descenso de temperatura;

por otra parte, con los genes aislados, se pueden realizar búsquedas de promotores inducibles por bajas temperaturas y utilizarlos como herramientas de biología molecular.

1.8.2 HIPOTESIS

En base a los estudios reportados en diferentes modelos mencionados anteriormente, donde se evidencia un cambio en la expresión genética en respuesta a un estrés abiótico, podemos esperar que en los frutos de banano cv "Enano Gigante" al ser sometidos a baja temperatura deben expresar genes relacionados con la respuesta a las bajas temperaturas.

1.8.3 OBJETIVO GENERAL

Obtener un pool de genes que se expresen diferencialmente en frutos de banano cv. Enano gigante a bajas temperaturas.

1.8.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer el tiempo sintomatológico del desorden fisiológico conocido como acanelamiento en el fruto de banano a 10 °C.
- Utilizar la técnica de Despliegue diferencial (DD) para encontrar los fragmentos de genes que se expresan o se reprimen diferencialmente en un estrés por bajas temperaturas.
- Realizar un análisis de expresión a por lo menos 4 fragmentos de genes diferenciales

1.9. BILIOGRAFIA

Baur, J. B. y M. Woarkman. 1964. Relationship between cell permeability and respiration in ripening banana fruit tissue. *Plant Physiol.* 39:540-43.

Bögre L, Ligterink W, Meskiene I, Barker PJ, HeberleBors E, Huskisson NS, Hirt H. 1997. Wounding induces the rapid and transient activation of a specific MAP kinase pathway. *Plant Cell* 9: 75-83.

Conklin BR, & Bourne HR. (1993) Structural elements of G α subunits that interact with G $\beta\gamma$; receptors and effectors. Cell 73: 631-634.

Crouch J. H., Vuylsteke D., Ortiz R. 1998. Perspectives on the application of biotechnology to assist the genetic enhancement of plantain and banana (*Musa* ssp). Electronic Journal of Biotechnology. <http://www.ejb.org>. 1: 1-12.

Deng Xing, Hu Zhi-Ang y Wang Hong-Xin 1999. mRNA differential Display by Silver Staining Tested on Gene Expression in Resurrection Plant *Boea hygrometrica*.

El-hilali F., Ait-Oubahou A., Remah A., Akhayat O. 2002. Chilling Injury And Peroxidase Activitychanges In "Fortune" Mandarin Fruit During Low Temperature Storage.bulg. j. plant physiol., 2003, 29(1-2), 44-54.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) 2001
www.fao.org.

FHIA (Fundación Hondureña de Investigación Agrícola) 2006
[<http://www.fhia.org.hn/>]

Fenton Navarro B., 2006. Glicobiología, una ciencia dulce universidad michoacana de san Nicolás hidalgo,
[<http://dieumsnh.qfb.umich.mx/glicobiologia.htm>]

Gibson S, Arondel V, Iba K, and Somerville C. (1994) Cloning of a Temperature-Regulated Gene Encoding a Chloroplast ω -3 Desaturase from *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 106: 1615-1621

Giovannoni J., 2001. Molecular biology of fruit maturation and ripening. Plant Physiol. Mol. Biol. 52: 725-749.

Goldman M., Seurinck J., Marins M., Goldman G. y Mariani C. 1998. A tobacco flower-specific gene codes a polyphenol oxidase. Plant Molecular Biology 36: 479-485.

Gómez, M. 1996. Perpectivas de la biotecnología vegetal en la fisiología de poscosecha de frutas comerciales. *Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería*. 397-404.

Gooding P., Bird C., Robinson S. 2001. Molecular cloning and characterization of banana fruit polyphenol oxidase. *Planta* 213: 748-757.

Heppard E., Kinney A. J, Stecca K. y Miao Guo-Hua (1996) Developmental and Growth Temperature Regulation of Two Different Microsomal ω -6 Desaturase Genes in Soybeans Plant Physiol. 110: 311-319

Hsieh TH, Lee JT, Yang PT, Chiu LH, Cham Y.Y, Wang YC, Chan MT. (2002) Heterology expression of the Arabidopsis C-repeat/dehydration response element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stress in transgenic tomato. *Plant Physiol* 129: 1086-1094.

Huang J.W., Pellet D.M., Papernik L.A. y Kochian L.V. (1996). Aluminium Interactions with voltage-dependent Calcium Transport in plasma membrane vesicles isolated from roots of Aluminium-Sensitive and Resistant wheat cultivars. *Plant Phisiology* 110: S61-S69.

Ichimura K., Mizoguchi T, Yoshida R, Yuasa T, y Shinosaki K. (2000) Various abiotic stresses rapidly activate Arabidopsis MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant J*. 24(5), 655-665.

Jaglo KR, Kleff S, Amudsen KL, Zhang X, Haake V, Zhang JZ, Deits T, Tomashow MF. (1998) Components of the Arabidopsis C-repeat/dehydration responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in Brassica napus and other plant species. *Plant Physiol*. 127: 910-917.

Kasuga M, Miura S, Shinisaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2004) A combination of the Arabidopsis DREB1A gene and stress-inducible RD29A promoter improved drought-and low temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. *Plant Cell Physiol*. 45:346-350.

Kennedy JF, Palva PMG, Corella MTS, Cavalcanti MSM, Coelho LCBB (1995) Lectins, versatile proteins of recognition: a review. Carbohydr Polym 26: 219-230

Lee H, Xiong L, Gong Z, Ishitani M, Stevenson B, Zhu JK. (2001) The Arabidopsis HOS1 gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a RING finger protein that displays cold-regulated nucleocytoplasmatic partition. Genes Dev. 15: 912-924.

Liang P. y Pardee A.B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction Science 257, 967-971.

Liu Q. , Y. Sakuma, H. Abe, M. Kasuga, S. Miura, K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain, separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. The Plant Cell 10:1391-1406.

Lyons, J.M. 1973. Chilling Injury in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 24:445-466.

Manrique-Trujillo S. M., 2006. Estudio de la expresión diferencial de genes involucrados en la maduración del fruto de banano (*Musa acuminata* cv.. "Gran Enano"). Tesis de doctorado del Centro de investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas, Departamento de Ingeniería Genética, Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas, Irapuato, Gto.

Matsumura T, Tabayashi N, Kamagata Y, Souma C, Saruyama H, 2002. Wheat catalase expressed in transgenic rice can improve tolerance against low temperature stress PHYSIOLOGIA PLANTARUM 116 (3): 317-327.

May G.D., Afza R., Mason H.S., Wiecko A. Novak F.J. and Arntzen C.J. 1995. Generación of transgenic Banana (*Musa acuminata*) Plants

via Agrobacterium-mediated transformation. Biotechnology, 13, 486-492.

Michinaka Y, Aki T, Shimauchi T, Nakajima T, Kawamoto S, Shigeta S, Suzuki O, Ono K. (2003) Differential response to low temperature of two $\Delta 6$ fatty acid desaturases from *Mucor circinelloides*. 62:362–368.

Miquel Martine, James Douglas Jr., Dooner Hugo, And Browse John (1993) Arabidopsis requires polyunsaturated lipids for lowtemperature survival Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 90, pp. 6208-6212,

Mikolajczyk M, Awotunde OS, Muszyńska G, Klessig DF & Dobrowolska G. 2000. Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. Plant Cell 12: 165–178.

Munnik T., Irvine R.F. & Musgrave A. 1998. Phospholipid signaling in plants, Biochimica et Biophysica Acta 1389, 222-272.

Murata N. y Los D.A. 1997. Membrana fluidity and temperatura perception. Plant Physiol. 115: 147-154

Nelson, D y Cox, M. 2000. Lehninger Principles of biochemistry. 3^{er} ed. Worth Publisher. New York, EUA.

Nguyen Thi B. T, Ketsa S, Van Doorn W. (2003) Relations between browning and the activities of polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase in banana peel during low temperature storage. Postharvest biology and technology 30: 187-193.

Oh SJ, Song SI, Kim YS, Jang HJ, Kim SY, Kim M, Kim YK, Hahm BH, Kim JK, (2005) Arabidopsis CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. Plant Physiol 138: 341-351.

Ortiz Vega R. A., López Moralez A., poncher Geller S. y Segura Mongue A. (2001) El cultivo del Banano. Edit.Universidad Estatal a Distancia (EUNED), Costa Rica, Cap. 10, pp. 167-183.

Orvar BL, Sangwan V. Omann F., Dhindsa. 2000. Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J.* 23: 785-794.

Pakin, K.L., Marangoni, A., Jackman, R., Yada, R., y Stanley, D. 1989. Chilling Injury. A review of possible mechanism. *J. Food Biochem.* 13. 127-153.

Pastori G, Foyer C. H. y Mullineaux P. 2000. Low temperature-induced changes in the distribution of H₂O₂ and antioxidants between the bundle sheath and mesophyll cells of maize leaves *Journal of Experimental Botany*, Vol. 51, No. 342, pp. 107-113.

Pellegrineschi A, Reynolds M, Pacheco M, Brito RM, Almeraya R, Yamaguchi-Shinozaki K, Hoisington D. 2004. Stress-induced expression in wheat of the *Arabidopsis thaliana* DREB1A gene delays water estress symptoms under greenhouse conditions. *Genome* 47: 493-500.

Peumans W. J., Proost P, Swennen R. L. y Van Damme J.M. 2002. The abundant class III chitinase homolog in young developing banana fruits behaves as a transient vegetative storage protein and most probably serve as an important supply of amino acid for the synthesis of ripening-associated proteins. *Plant Physiology*, vol. 130, pp. 1063-1072.

Polle A. 1997. Defense against photooxidative damage in plants, in: Oxidative Stress and The Molecular Biology of antioxidant Defenses. (Scandalios J.G., ed). Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor. Pp. 623-666.

Pratt, H.K. 1975. The role of ethylene in fruit ripening: facteurs et regulation de la maduration des fruits. Center National de la Recherche, Anatole. France.

Provart N. J., Gil P, Chen W, Han B, Chang Hur-Song, Wang X, y Zhu T. 2003. Gene Expression Phenotypes of *Arabidopsis* Associated with Sensitivity to Low Temperatures. *Plant Physiology*, Vol. 132, pp. 893-906.

Puebla A. y Del Viso F. 2004. Biotecnología y mejoramiento vegetal, capítulo 12, Tolerancia a factores abióticos. Edit. INTA, pp. 355-365.

Purvis A.C., Shewfelt R.L. and Gegogeine J.W. 1995. Superoxido production by mitochondria isolated from green bell pepper fruit. *Physiol Plant* 94:743-749.

Robinson J. C. 1996. Bananas and plantains. UK. University Press Cambridge. Cap 2.

Ruelland E, Cantrel C, Gawer M, Kader JC, Zachowski A. 2002. Activation of phospholipases C and D is an early response to a cold exposure in *Arabidopsis* suspension cells. *Plant Physiol.* 130:999-1007.

SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación), 2002. www.sagarpa.com.mx/cgcs/.

Saijo Y., S. Hata, J. Kyozuka, K. Shimamoto and K Izui 2000. Overexpression of a single Ca²⁺ dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *The Plant Journal* 23:319-327.

Sangwan V., Foulds I., Singh J., Dhindsa RJ. 2001. Cold-Activation of *Brassica napus* BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca⁺² influx. *Plant J.* 27: 1-12.

Scoofs Hilde, 1997. The origin of embryogenic cells in *Musa*. Thesis PhD. KULeuven, Belgium. 257pp.

Seymour, G.B., Taylor, J.E. and Tucker, G.A. 1993. Biochemistry of fruit ripening. Chapman & Hall. Cambridge. 454 p.

Sharom M, Willemond C. y Thompson J. E. 1994. Chilling Injury Induces Lipid Phase Changes in Membranes of Tomato Fruit. *Plant Physiol.* 105: 305-308.

Sharon N y Lis H 1989. Lectins. Chapman & Hall, New York

SIAP (Sistema Integral de Información Agroalimentaria y Pesquera), 2005, www.siap.sagarpa.gob.mx.

Skog Lisa J. 1998. Chilling Injury of Horticultural Crops, Ministry of Agriculture Food and Rural Affairs, <http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/facts/98-021.htm> [31/Mayo/2006].

Smith, N.S.J. 1981. Softening and cell wall changes in bananas and plantains. In: Tropical fruit – aspects of applied biology. Vol 12: 95-107.

SMN (Servicio Metereológico Nacional) Comisión Nacional del Agua [<http://smn.cna.gob.mx/>] enero-Marzo 2006.

Soto-Ballesteros M. 1985. Bananos, Cultivo y Comercialización. Costa Rica. Ed. Lil S.A. Cap:1,2 y 4.

Spilatro SR, Cochran GR, Walker RE, Cabliss KL, Bittner CC 1996. Characterization of a new lectin of soybean vegetative tissues. Plant Physiol 110: 825-834

Sung Dong-Yul, Kaplan F, Lee Kil-Jae y Guy C. L. 2003. Acquire tolerance to temperature extremes. TRENDS in plant science, vol. 8, 179-187.

Susuki Nobuhiro y Mittler Ron, 2006. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. Physiologia Plantarum 126; 45-51.

Suzuki I., Los D.A., Kaneshaki Y., Mikami K. y Murata M. 2000. The pathway for perception and transcription of low-temperature signals in *Synechocystis*. EMBO J. 19: 1327-1334.

Swennen R., Vuylsteke D. and Ortiz R. 1995. Phenotypic diversity and patterns of variation in west and central African plantains (*Musa* spp., AAA group *Musaceae*). Economic Botany 49:320-327.

Thomashow M. F. 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 571–599

Urao T, B. Yakubov, R. Satoh, K. Yamaguchi-Shinozaki, M. Seki, T. Hirayama and K Shinozaki, 1999. A transmembrane hybrid-type histidina kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *The Plant Cell*, 11:1743-1754

USDA (Agricultural export transportation handbook) 24/01/04, products sensitive to chilling injury, when held below their recommended temperature, www.ams.usda.gov/tmd/export/chilling_injury.htm.

Wang XQ, Ullah H, Jones AM, Assmann SM, 2001. G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Science* 292, 2070-2072.

Wills, R.B.H., Bailey W., Scott, K. 1975. Possible involvement of a-farnesene in the development of chilling injury in banana. *Plant Physiology*. 56:550-551.

Xiong L, Ishitani M, Lee H, Zang C, & Zhu JK, 2001. FIERY1 encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 15: 1971-1984.

Xiong L. y Yang Y. 2003. Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *The plant Cell* 15:745-759.

Yadav N. S, Wierzbicki A., Aegeuter M, Caster C. S, Pérez-Grau L, Kinney A. J, Hitz W. D, Booth Ir j, Russell, Schweiger B, Stecca K, Allen S, M, Blackwell M, Reiter R S, Carlson T. J, Russell S. H, Feldmann K. A, Pierce j, and Browse J. 1993. Cloning of Higher Plant ω -3 Fatty Acid Desaturases' *Plant Physiol*. 103: 467-476

Yuasa T., K. Ichimura, T. Mizoguchi and K. Shinozaki 2001. Oxidative stress activates ATMPK6, and *Arabidopsis* homologue of MAP kinase. *Plant and Cell Physiology* 42:1012-1016.

Zhang W, Pneumans WJ, Barre A, Houles-Astoul C, Rovira P, Rougé P, Proost P, Truffa-Bachi P, Jalali HA, Van Damme EJM 2000. Isolation and characterization of a jacalin-related mannose-binding lectin from salt-stressed rice (*Oryza sativa*) plants. *Planta*, vol. 210 no. 6, 970-978.

Zhang Shuqun y Klessing Daniel F., 2001. Mapk cascades in plant defense signaling. *TRENDS in Plant Science*, vol. 6 No. 11, 520-526.

Capitulo II. Low temperature induce differential expression genes in banana fruits

J.H. Caamal-Velázquez , B.H. Chi-Manzanero , J.J. Canche-Yam , E. Castaño , L.C. Rodríguez-Zapata.

Este articulo fue publicado en *Scientia Horticulturae* Vol. 114, issue 2, 2007, p.p. 83-89

2.1 ABSTRACT

Differential display was used to identify gene expression of banana fruit in response to low temperature stress. Banana fruits were kept at 10 °C for 8 h and 60 differential expressed fragments in pulp and peel were obtained. These fragments had an average size of 200 pb or greater and Dot blotting hybridization as well as Northern blot corroborated specific expression of these differential expressed fragments. Among the several differentially expressed genes, we found genes involved in response to pathogen attack, wounding and a ripening-associated gene. We consider these genes to belong to a general pathway which is activated upon general stress signaling.

Keywords: Bananas; cDNA; Low temperature injury; Differential display; *Musa acuminata*

2.2 INTRODUCTION

Environmental stresses include several factors that are well known to have an effect on plant growth and seed production (Shinozaki *et al.*, 2003). In banana fruits low temperature causes alterations in the physiology which includes retarded development of the yellow skin color and failure of the fruit to become soft (Jiang *et al.*, 2004). Banana fruits contain high levels of starch (15–39%) which undergo a drastic biochemical change during ripening (Lizada *et al.*, 1990). The change includes a marked increase in soluble sugars and organic acids, chlorophyll breakdown and polymerization of phenolic compounds in the ripening fruits (Pawlowski *et al.*, 1994). When tropical and subtropical fruits are exposed to low temperature injury, abnormal

ripening, pitting, water-soaked areas and increased susceptibility to fungal infection occur (Sharom *et al.*, 1994). Cellular membrane damage is a typical symptom that occurs during early low temperature injury (Marangoni *et al.*, 1996). It has been reported that the browning (low temperature injury symptom) in banana peel is caused by the oxidation of polyphenols caused primarily by polyphenol oxidase (PPO) (Yang *et al.*, 2000). Nguyen Thuy *et al.* (2003) report that when the banana fruits are exposed to low temperatures, an increase activity of both phenylalanine ammonia lyase (PAL) and PPO occurs (Nguyen Thuy *et al.*, 2003). In low temperature sensitive plants oxidative stress is a major component of chilling stress and active oxygen species (AOS) such as hydrogen peroxide, superoxide radicals and hydroxyl radicals that can react very rapidly with DNA, lipids and proteins causing severe cellular damage (Van Breusegem *et al.*, 1999). Many genes induced by stress have been identified to be essential for stress tolerance, which included genes of lipid metabolism, chloroplast function, free radical detoxification, etc. (Provart *et al.*, 2003). Many important crops and fruits are injured by exposure to low, nonfreezing temperatures in the range of 0–12 °C. The effects may be multigenic and the molecular mechanisms are not well understood. Low temperature injury also limits the extended life storage of many vegetables and fruits (Jiang *et al.*, 2004; Ratule *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003; Trakulnaleumsai *et al.*, 2006). In tropical and subtropical fruits the damage caused by low temperature stress as surface discoloration where the subepidermal tissues reveal dark-brown streaks and pulp browning are well documented among several physiological symptoms (Kader A., com pers; Jones, 2000); however, the genes involved during this type of stress are unknown in banana fruits. Therefore, in order to elucidate the molecular mechanisms underlying the low temperature response genes of banana fruits, we first used mRNA differential display (DD) to search for differentially expressed genes during the low temperatures process. This allows a first step in defining some of the players involved directly and indirectly in the response of the fruit to an adverse low temperature injury. The effect of low temperatures result in severe losses for the banana producers during winter cold spells in the tropics. Therefore this work is a first attempt to define the genes expressed under low temperatures.

2.3 MATERIAL AND METHODS

2.3.1. FRUIT MATERIAL

Bananas fruits (*Musa acuminata* cv "Grand Nain") were obtained from banana plants grown in a set breeding ground. Plants were cultivated at 1500–2000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{S}^{-1}$, 40% RH and average temperature of 37 °C. The fruits were harvested in the fourth stage of ripening (more yellow than green); according to stage proposed to Customers Services Department Chiquita Brands, Inc., cincinnati, OH. (Clendennen and May, 1997). We harvested the first two hands of each cluster (four bananas) and took one hand of each cluster for treatment, hands of fruit randomized and allocated to treatment. For the low temperature untreated and treated, fruits were incubated at room temperature (23 °C) or at 10 °C during 8 h, respectively (Jones, 2000). Each treatment had two replicas. Four fruits of each hand were collected, pulp and peel were separated and frozen in liquid nitrogen.

2.3.2. RNA EXTRACTION

Total RNA was isolated as previously publish (Medina-Escobar *et al.*, 1997) with the following modifications. All the steps were developed in ice and the pellets were obtained by centrifugation at 16060 x g in a Beckman rotor JA20 (Beckman). Two grams of fruit tissue (peel or pulp) were frozen in liquid nitrogen and ground to a fine powder. The ground material was homogenized in 10 ml of RNA extraction buffer (100 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA pH 8 and 500 mM, NaCl); 1.4% b-Mercaptoethanol and 2% SDS and incubated for 15 min at 65 °C. After of this incubation 1.5 M potassium acetate was added and the samples were incubated for 10 min at 20 °C. The supernatant was obtained by centrifugation 16060 x g for 30 min at 4 °C. The aqueous phase was recovered, and the total RNA was precipitate by addition of one volume of isopropanol; the samples were incubated for 1 h at 20 °C and centrifuged for 30 min at 4 °C. The pellets were resuspended with 100 ml of TE (100 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA pH 8), and 300 mM, acetate sodium and 50% isopropanol was added to the mixture; the samples were incubated overnight at 20 °C and centrifuged; the pellets washed with 70% EtOH, centrifuged and resuspended with nuclease free-water. LiCl (4 M) was added to the mixture to a final concentration

of 4 M and the samples were incubated for overnight, centrifuged for 45 min as indicated above at 4 °C. The pellets washed with 70% EtOH, and resuspended with nuclease free-water.

2.3.3. mRNA DIFFERENTIAL DISPLAY

mRNA differential display was carried out as is described in the handbook of GeneHunter Corporation (1997). Total RNA of four fruits were quantified and pooled, to realize DD. Total RNA was treated with DNase I (Invitrogen) and used for reverse transcription. For each sample, three reverse transcription reactions were set up, containing one of the three different HT11M primer (where M can be A, C or G) anchored to the beginning of the poly(A+) tail. SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) was added after pre-incubation for 5 min at 65 °C and for 2 min at 42 °C. Reverse transcription was performed by incubation at 42 °C for 50 min, then was stopped by inactivating the SuperScript II reverse transcriptase for 15 min at 70 °C. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of each reverse transcription products was carried out in combination with one of eight arbitrary primers. PCR was carried out in a thermal cycler (Techne TC-412) under the following conditions: 1 cycle of 94 °C for 30 s; 35 cycles of 94 °C for 30 s; 40 °C for 1 min; 72 °C for 30 s and a final extension at 72 °C for 15 min. The amplified cDNAs were separated by denaturing polyacrylamide electrophoresis using Bio-Rad Sequi-Gen1 GT Nucleic Acid Electrophoresis Cell (Bio-Rad). 10 µl of each PCR sample was incubated with 3 µl of loading dye at 95 °C for 5 min immediately, cooled on ice and loaded in gel of polyacrylamide. Amplified fragments were visualized by a silver stain.

2.3.4. SILVER STAINING

Silver Staining basically performed as describe previously by Bassam *et al.*, (1991). With the following modifications; the gel was fixed with 10% acetic acid (v/v) and stained with 3% silver nitrate activated with 0.15% formaldehyde for 30 min and development with 3% sodium carbonate, 2% sodium thiosulfate and 0.15% formaldehyde. The reaction was stopped with 10% acetic acid (v/v).

2.3.5. CLONING AND SEQUENCING

Differentially expressed cDNA fragments were recovered as indicated (Wang *et al.*, 1998). The bands of differentially expressed cDNA fragments were cut from the gel and transferred to an eppendorf tube with 50 ml of nuclease free water and incubated for 2 h at 40 °C. The gel debris was spin down and the supernatant containing the DNA was collected. This DNA was used as template to reamplify the specific fragment using the same set of primers. PCR was carried out in a thermal cycler under the following conditions: 35 cycles of 94 °C for 30 s; 40 °C for 1 min; 72 °C for 30 s and a final extension at 72 °C for 15 min. The samples were separated in 1% agarose gel, and every band was isolated by GENE CLEAN1 II KIT (Q-Biogene). The isolated bands were cloned using the pGEM1-T Easy kit (Promega) and transformed into the strain *E. coli* DH10B using calcium protocol transformation (Sambrook and Russell, 2001). Plasmid DNA was isolated using the QIAprep1 Miniprep (QIAGEN) kit. Plasmid DNA templates were sequenced, using T7 primer. Edited sequences were loaded into National Center for Biotechnology Information form for BLAST (9.1) (Altschul *et al.*, 1990; Gish and States, 1993).

2.3.6. NORTHERN BLOT AND DOT BLOT HYBRIDIZATIONS

Plasmids containing the DNA inserts were affixed to Hybond-N+ nylon membrane (Amersham Pharmacia Biotech) using the convertibleTM filtration manifold system (GIBCOBRL). For Northern blot, total RNA (10 mg) was resolved by electrophoresis on 1.5% agarose gel contained formaldehyde, blotted onto a nylon membrane (Sambrook and Russell, 2001). The nylon membranes were air-dried, UV cross-linked (UVC 500 Cross-Linker, Amersham/Biosciences). The nylon membranes were prehybridized for 15 min at 50 °C and hybridized with the first-strand cDNA of the chilling-treated and untreated fruits (Dot blot), and hybridized with different probes (17-3C, 20-1C, 2-1C, 22-5P and 13-3P) in Northern blot assay. The membranes were then washed according to the protocol of Gene Images AlkPhos Direct Labeling and Detection System (Amersham/Biosciences). The filters were subjected to autoradiography (HyperfilmtmECL, Amersham/Bioscience) for 1 h.

2.4. RESULTS

2.4.1. LOW TEMPERATURE SYMPTOMS AND TOTAL RNA INTEGRITY

We determined the specific time when low temperature symptoms appear in banana fruits. Fig. 2.4.1.1. shows a temporal course of banana fruits submitted at 10 °C or 23 °C (room temperature). The low temperature injury symptoms appear after 8 h exposure to the low temperature treatment; where the banana subepidermal tissues revealed dark-brown streaks due to this stress. No degradation of total RNA was observed in different tissue of the banana fruit after the treatment. Fig. 2.4.1.2 shows no degradation of the rRNA from the total RNA extraction. Additionally total RNA was used to PCR using universal primers (actin) as indirect indicator of integrity of total RNA (data not shown). This result suggests that the time of incubation and temperature used does not cause a general degradation of ribonucleic acids in the banana fruits.

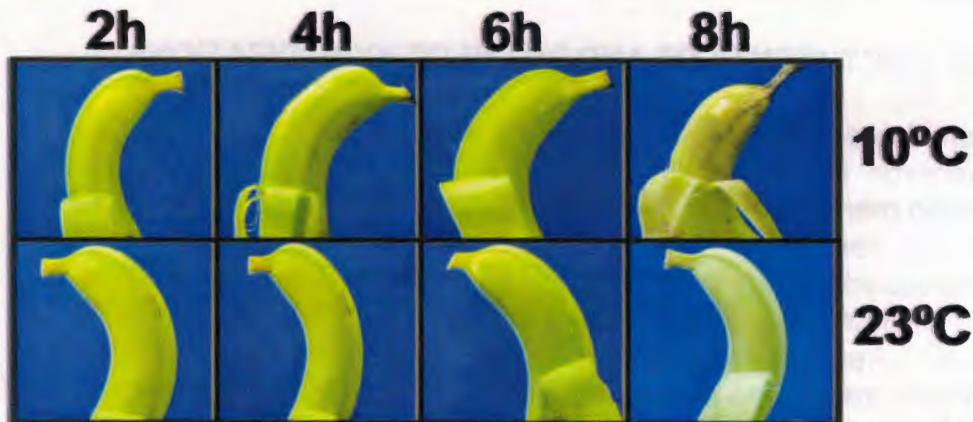


Fig. 2.4.1.1. Temporal course of banana fruits submitted at 10 °C or 23 °C (room temperature). The chilling injury symptoms appear after of 8 h to low temperature treatment; where the banana subepidermal tissues revealed dark-brown streaks due to this stress.

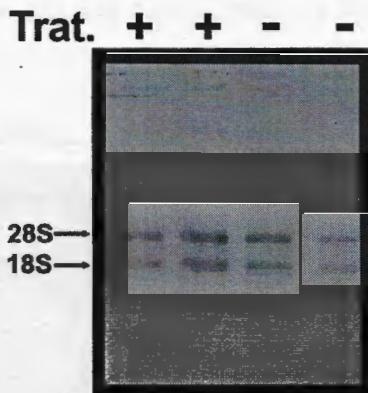


Fig. 2.4.1.2. Total RNA isolated from pulp and peel of the banana fruits with (+) and without (-) low temperature. The banana fruits were incubated during 8 h at 10 °C. Nucleic acids were separated in 1% no denaturing-agarose gel.

2.4.2. mRNA DIFFERENTIAL DISPLAY

Differential display was used as a general strategy to obtain fragment of genes differentially expressed under stress condition (low temperature), this technique amplifies cDNA sequences from subsets of mRNAs by reverse transcription and PCR. Total RNA obtained from low temperature treated and untreated banana fruits were obtained. Amplified transcripts of RNA extracted from the differently treated banana fruits (peel and pulp) were clearly visualized by silver staining after separation by PAGE. For every combination of three anchored and eight primers numerous identical bands of amplified cDNA were displayed as we exemplify in fig. 2.4.2.1. We obtained 107 differential bands from the banana pulp and 42 differential bands from the banana peel. The sizes of bands were corroborated after their cloning (data not shown). In the case of banana pulp 25 differential bands were obtained using the set primer HAP30 or HAP31, and as anchored primer HT11G. For banana peel, 10 differential bands were obtained using the set primers HAP27, HAP28 and HAP29, and as anchored primer HT11G. We analyzed the sequences of 35 differential recombinants bands obtained from the pulp and peel of the banana, respectively. Sequence alignment and homology searches indicate that only 16 differential fragments from the pulp and three differential fragments from the peel

have a similitude to other plants sequences. Their sequences analysis is summarized in the Table 2.4.2.1 and Table 2.4.2.2, respectively.

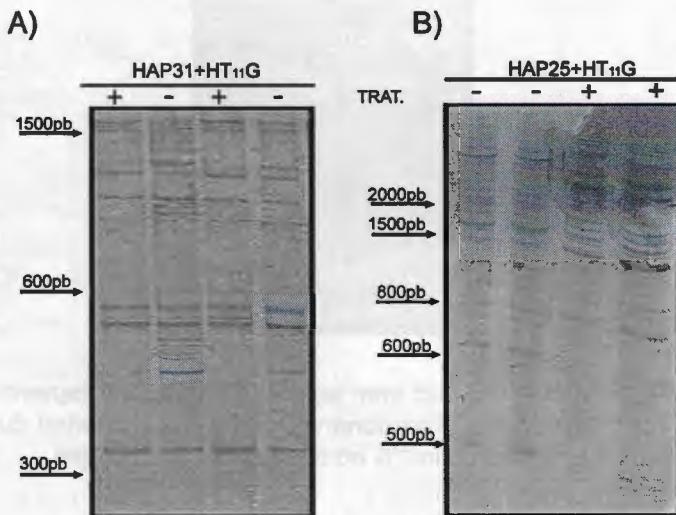


Fig. 2.4.2.1. Example of mRNA differential display from banana fruits. Banana fruits were incubated (+) or not incubated (-) during 8 h at 10 °C and the DNA fragments were separated in polyacrylamide gel and staining with nitrate silver. A) PCR product from banana pulp using differential primers HAP31 and HT11G. B) PCR product from banana peels using differential primers HAP25 and HT11G.

Table 2.4.2.1. Bananas peel genes that are differentially expressed during low temperature treatment

| Clone | GeneBank Accession No. | Probably Homology | % Identity |
|----------|------------------------|---|------------|
| 2-1C (1) | EB085183 | <i>Musa acuminata</i> mRNA for putative pseudogene chitinase isoform 2 partial cDNA (MAC277279). | 98 |
| 17-3C(1) | EB085182 | <i>Musa acuminata</i> mRNA for putative catalase (CAT2) of <i>Brassica juncea</i> , partial cDNA (AF104452). | 77 |
| 20-1C(1) | EB085184 | <i>Musa acuminata</i> mRNA for putative ripening-associated protein mRNA partial cDNA, pseudogene (AF001527). | 94 |

The clone designation of a representative of each non redundant group of cDNA isolates appears in the first column. Indicated in parentheses is the total number of homologous clones isolated. Putative cDNA identities are based on sequence homology.

Table 2.4.2.2. Bananas pulp genes that are differentially expressed during low temperature treatment

| Clone | Gene Bank Accession No. | Probably Homology | % Identity |
|----------------------------------|-------------------------|---|------------|
| 6-7P(3) 11-4 15-2 | EB085191 | <i>Musa acuminata</i> mRNA like polymerase alpha chain of <i>Yucca schidigera</i> , pseudogene HVZ77764 | 80 |
| 9-7P(1) | EB085193 | <i>Musa acuminata</i> mRNA like séquense of <i>Zea mays</i> pseudogene AY106587 | 77 |
| 11-10P(2) | EB085179 | Partial seqquence of <i>Musa acuminata</i> clone MuG9, genomic séquense, pseudogene JP 2001517446-A/9 | 88 |
| 12-8P 13-6P(1) | EB085180 | <i>Musa acuminata</i> mRNA like contig of <i>Hordeum vulgare</i> , pseudogene, AF521177 | 57 |
| 24-4P(4) 25-6 18-2 22-5 | EB085186 | <i>Musa acuminata</i> mRNA unknow clone 24-4P, pseudogene | |
| 16-2P(1) | EB085181 | <i>Musa acuminata</i> mRNA unknow clone 16-2P, pseudogene | |
| 5-6P(1) | EB085189 | <i>Musa acuminata</i> mRNA unknow clone 5-6P, pseudogene | |
| 7-3P(1) | EB085192 | <i>Musa acuminata</i> mRNA unknow clone 7-3P, pseudogene | |
| 23-4P(1) | EB085185 | <i>Musa acuminata</i> mRNA unknow clone 23-4P, pseudogene | |
| 26-1P(1) | EB085187 | <i>Musa acuminata</i> mRNA unknow clone 26-1P, pseudogene | |

The clone designation of a representative of each nonredundant group of cDNA isolates appears in the firs column. Indicated in parentheses is the total number of homologous clones isolated. Putative cDNA identities are based on sequence homology.

2.4.3. NORTHERN BLOT AND DOT BLOT HYBRIDIZATION

At present time there are several techniques that allow fast corroboration of gene expression, we used Dot blot hybridizing as a first approach to verify differential expression followed by Northern blot on the selected genes to verify the changes in gene expression. Relative low temperature transcript abundance in pulp and peel of banana were estimated by hybridization of RT-PCR products. Results of Dot blot hybridization and Northern blot assay confirm low temperature cDNA differential expression in pulp and peel of banana fruits (Figs. 2.4.3.1 and 2.4.3.2). In the case of banana peel the clone 2-1C (*Musa acuminata* Chitinase isoform 2), 17-3C (similar to *Brassica juncea* Catalase) and 20-1C (*Musa acuminata* ripening-associated protein) give a positive strong-labeled signal, the clone 16-2 (*Musa acuminata* 16s ribosomal RNA gene) was used as a control (see Fig. 2.4.3.1.A and Table 2.4.2.1). Same result were obtained with clones from banana

pulp 11-4P, 9-7P, 11-10P, 24-4P and 23-4P (see Fig. 2.4.3.2.B and Table 2.4.2.2). They also give a strong signal while the clone 5-6P and 7-3P showed a weak signal (data not shown). In the Table 2.4.2.2, we observed that the clone 11-4P has a homology with a polymerase while the rest of the clones, 9-7P, 11-10P, 24-4P and 23-4P have similarity to several pseudogenes from different species of plants (*Z. mays*, *O. sativa* and *A. thaliana*), these fragments like mRNA of unknown proteins. Results of Northern blot assay show that fragments 17-3C, 20-1C, 2-1C and 22-5P change expression at low temperature in banana fruits (see Fig. 2.4.3.2).

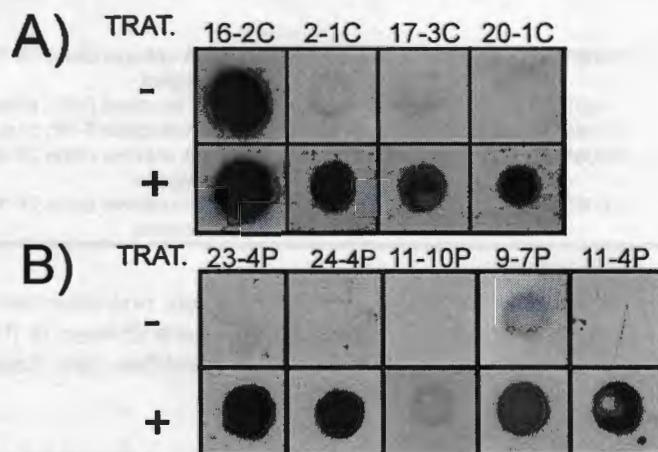


Fig. 2.4.3.1. Dot blot assay. Plasmids containing the indicated differential fragment cDNA were affixed to nylon membrane and hybridized with the first-strand cDNA of the low temperature-treated (+) and untreated (-) fruits. A) Differential recombinant fragment from banana peel. B) Differential recombinant fragment from banana pulp.

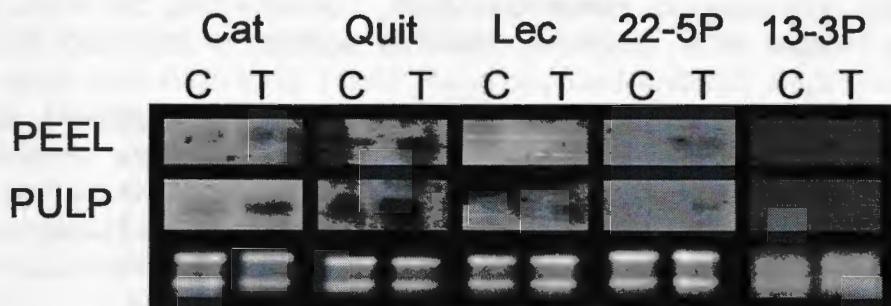


Fig. 2.4.3.2. Northern blot assay. Differential expression in banana fruits was determined by Northern blot analysis of total RNA from pulp and peel. Blots were hybridized with probes purified of plasmid containing differentially expressed fragment (Cat-17-3C(catalase), Quit-2-1C (quitinase), Lec-20-1C (lectin), 22-5P (unknown) and 13-3P (unknown)), equivalence of RNA loading of the lanes was demonstrated by ethidium bromide staining.

2.5. DISCUSSION

Storing banana fruits at low temperature (14–4 °C) results in a decrease shelf life by softening pulp and peel that show as dark-brown spots. In this work we identify a pool of fragment genes differentially expressed at low temperatures using differential display technique. Over the last 14 years DD has been used to isolated genes involved in physiological events, signal transduction, stress response and secondary metabolism. DD has also been used in inclusive profiling of genes expressed in particular plant cell types (Yamazaki and Saito, 2002). In the case of tropical and subtropical fruits, like banana, there is little information about the low temperature expressed genes. This information could allow one day, to block specific pathways that currently result in a production losses of pre- and post-harvesting. Adverse weather can cause physiological alterations in the banana fruits. Depending on the cultivar chilling injury results from exposing bananas to temperatures below 13 °C for a few hours to a few days (Kader A., com pers.; Jones, 2000). In the case of the "Grand Nain" cultivar; the chilling injury symptoms appeared after of 8 h at 10 °C; whole banana subepidermal tissues revealed dark-brown streaks under this stress (see Fig. 2.4.1.1). The quality of the undegraded RNA (Fig. 2.4.1.2) was evaluated by the amplification of actin as constitutive

control gene (data not shown); as comparable with other methods of total RNA extraction of climacteric fruits. For example, the work of Medina-Escobar *et al.*, which reported the isolation of total RNA from strawberry fruits (Medina-Escobar *et al.*, 1997). This RNA was used to identify differentially expressed genes during its ripening process. DD was carried out and differential expressed fragments were obtained (Fig. 2.4.2.1.). We can mention specifically the fragment 20-1C that is expressed differentially in peel of banana when it was treated under low temperatures, (see Fig. 2.4.3.1. A), however, in Northern hybridization we only detected the signal in banana pulp (see Fig. 2.4.3.2.). The fragment 20-1C has 98% of identity with *Musa acuminate* ripening-associated protein (Clendennen and May, 1997) and its sequence has a lectin motif. It is known that lectins may be involved in the recognition between cells or cells and various carbohydrate-containing molecules (Gouget *et al.*, 2006) and appear to play an important role in the defense mechanisms of plants against the attack of microorganisms, pests, and insects (Saha *et al.*, 2006). Furthermore, fungal infection or wounding of the plant seems to increase lectins (Clendennen and May, 1997). Another fragment found by DD technique is the fragment 2-1C that shows a 98% of homology to a banana chitinase. This gene is related to damage caused by insects or fungi attack, nevertheless it has been reported that this enzymes can work like antifreeze due to the capacity to slow down extra cellular rice formation (Hon *et al.*, 1995; Antikainen *et al.*, 1996; Griffith *et al.*, 1997). The results show an increase expression in pulp and peel of banana fruits upon treatment banana fruits, suggesting that these genes are upregulated during low temperature injury. On the other hand the sequence of fragment 17-3C shows a 77% of identity to a catalase of *Brassica juncea*. Together with superoxide dismutase and hydroperoxidase, catalase is part of a defense system for scavenging superoxide radicals and hydroperoxides. Catalase is required to dismutate H₂O₂ produced during the peroxisomal oxidation of glycolate to glyoxylate, an intermediate step in the photorespiratory pathway (Frugoli *et al.*, 1998). In the case of banana pulp we could not identify similar sequences from the gene database. Hybridization experiments (Dot blotting and Northern blot) suggest that the expression are specific to pulp and peel at low temperature (see Figs. 2.4.3.1. and 2.4.3.2.) and it is not found in other kind of stress as is wounding stress or fruit ripening (data not shown). The entire sequence fragment isolated from the pulp had no

nucleotide sequence identity with respect to other known genes; new genomic information in banana cultivars are necessary to identify the homology genes found pulp in this study. But new information about the chilling expression of several genes is available recently using as model *Arabidopsis* sp. plants (Provart *et al.*, 2003). Several of the genes identified in this study did not provide a positive homology with known databases, including the gene database (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) reported by Provart *et al.* (2003). These negative results obtained from banana using the Provart Gene database could be explained because we used as model banana fruits to perform the low temperature differential expression and not the whole banana plant; as were made in *Arabidopsis* sp., several genes are expressed specifically in fruits and not in the whole plants (data not shown). The fragments 22-5P and 13-3P were analyzed for differential expression at low temperature; this study reveals that fragment 22-5P is upregulated for low temperature, while fragment 13-3P not was detected. In this work we focus on the genetic expression from the banana plant fruit under low temperature stress conditions that are typical for the regions in Mexico in which this cultivar is grown; further studies could be important to identify the possible function of the banana genes found in this study and would be relevant for later characterization of their promoters.

2.6. ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported by CONACYT (SAGARPAC01-2002-1714) and International Foundation for Science (C/3959-1). We thank for his agronomic technical support to Fernando Contreras, to Patricia Flores-Perez for her technical support and also to Rossana Marrufo for her technical support in the elaboration of the article figures. We also thank Luis Figueroa (Accesolab) for some kindly providing molecular reagents.

2.7. REFERENCES

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Antikainen, M., Griffith, M., Zhang, J., Hon, A.C., Yang, D.S.C., Maunsbach, K.P., 1996. Immunolocalization of antifreeze proteins in winter rye leaves crowns and roots by tissue imprinting. *Plant Physiol.* 10, 854–857.
- Bassam, B.J., Caetano-Anolle's, G., Gresshoff, P.M., 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 196, 80–83.
- Clendennen, S.K., May, G.D., 1997. Differential gene expression in ripening banana fruit. *Plant Physiol.* 115, 463–469.
- Frugoli, J.A., McPeek, M.A., Thomas, T.L., McClung, C.R., 1998. Intron loss and gain during evolution of catalase gene family in angiosperms. *Genetics* 149, 355–365.
- GeneHunter corporation. 1997. Manual RNAimage1 mRNA Differential Display system, home page <http://www.GeneHunter.com>.
- Gish, W., States, D.J., 1993. Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat Genet.* 3, 266–272.
- Gouget, A., Senchou, V., Govers, F., Sanson, A., Barre, A., Rouge, P., Pont-Lezica, L.R., Canut, H., 2006. Lectin receptor kinases participate in protein interaction to mediate plasma membrane-cell wall adhesions in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 140, 81–90.
- Griffith, M., Antikainen, M., Hong, W.C., Maunsbach, K.P., Yu, X.M., Chun, J.U., Yang, D.S.C., 1997. Antifreeze proteins in winter rye. *Physiol. Plant* 100, 327–332.

Hon, W.C., Griffith, M., Mlynarz, A., Kwok, Y.C., Yang, D.S.C., 1995. Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol.* 109, 879–889.

Jiang, Y., Joyce, D.C., Jiang, W., Lu, W., 2004. Effects of chilling temperatures on ethylene binding by banana fruit. *Plant Growth Regul.* 43, 109–115.

Jones, D.R., 2000. Diseases of banana, abaca, and enset. CABI Publishing. Droitwich, Spa, Worcestershire, UK, pp. 353–360.

Lizada, M.C.C., Pantastico, B.Er., Shukor Abd, A.R., Sabari, S.D., 1990. Ripening of banana. In: Hasson, A., Pantastico, B. (Eds.), Banana. ASEAN Food handling Bureau, Kuala Lumpur, pp. 65–83.

Marangoni, A.G., Palma, T., Sanley, D.W., 1996. Membrane effects in postharvest physiology. *Postharvest Biol. Technol.* 7, 193–217.

Medina-Escobar, N.J., Ca'rdenas, V., Valpuesta, Mun'oz-Blanco, J., Caballero, J.L., 1997. Cloning and characterization of cDNA from genes differentially expressed during the strawberry fruit ripening process by a MAST-PCR-SBDS method. *Anal. Biochem.* 248, 288–296.

Nguyen Thuy, T.B., Ketsa, S., van Doorn, W.G., 2003. Relationship between browning and the activities of polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase in banana peel during low temperature storage. *Postharvest Biol. Technol.* 30, 187–193.

Pawlowski, K., Kunze, R., de Vries, S., Bisseling, T., 1994. Isolation of total, poly (A) and polysomal RNA from plant tissues. In: Gelvin, S.B., Schilperoof, R.A. (Eds.), Plant Molecular Biology Manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holland, Pp D5:1-13.

Provart, N.J., Gil, P., Chen, W., Han, B., Chang, H.-S., Wan, X., Zhu, T., 2003. Gene expression phenotypes of *Arabidopsis* associated with sensitive to low temperatures. *Plant Physiol.* 132, 893–906.

Ratule, M.T., Osman, A., Ahmad, S.H., Saari, N., 2006. Development of chilling injury of 'Beragan' banana (*Musa* cv Beragan (AAA) during storage at low temperature. *J. Food Agric. Environ.* 4 (1), 128–134.

Saha, P., Majumder, P., Dutta, I., Ray, T., Roy, S.C., Das, S., 2006. Transgenic rice expressing *Allium sativum* leaf lectin with enhanced resistance against sap-sucking insect pest. *Planta* 223, 1329–1343.

Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. Molecular Cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sanchez-Ballesta, M.T., Lluch, Y., Gosálbez, M.J., Zacarias, L., Grandell, A., Lafuente, M.T., 2003. A survey of genes differentially expressed during long-term heat-induced chilling tolerance in citrus fruit. *Planta* 218 (1), 65–70.

Sharom, M., Willemot, C., Thompson, J.E., 1994. Chilling injury induces lipid phase changes in membranes of tomato fruit. *Plant Physiol.* 105, 305–308.

Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., 2003. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 410–417.

Trakulnaleumsai, C.A., Ketsa, S.A., Van Doorn, W.G.B., 2006. Temperature effects on peel spotting in 'Sucrier' banana fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 39 (3), 285–290.

Van Breusegem, F., Slooten, L., Stassart, J.-M., Moens, T., Boterman, J., Van Montagu, M., Inze', D., 1999. Overproduction of *Arabidopsis thaliana* FeSOD confers oxidative stress tolerance to transgenic maize. *Plant Cell Physiol.* 40, 515–523.

Wang, H., Zhenbiao, X., Yaohe, W., Chunhai, L., y Ya, S.L., 1998. Recovering and Reamplifying of the differentially expressed cDNA Bands Isolated from mRNA Differential Display. *Mol. Biotechnol.* 9, 171–173.

Wang, Y., Lu, W., Jiang, Y., Luo, Y., Jiang, W., Joyce, D., 2006. Expression of ethylene-related expansin genes in cool-stored ripening banana fruit. *PlantSci.* 170, 962–967.

Yamazaki, M., Saito, K., 2002. Differential display analysis of gene expression in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1246–1255.

Yang, C.-P., Shuji, F., Ashrafuzzaman, M.D., Nakamura, N., Hayashi, N., 2000.

Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.). *Pulp. J. Agric. Food Chem.* 48, 2732–2735.

CAPITULO III. Banana fruit-Catalase 2 (*MaCat 2*) is specifically expressed in response to low temperature and mechanic damage

Caamal-Velázquez Humberto, Cano-Sosa Julia, Chi-Manzanero Bartolomé, Castaño Enrique, Rodríguez-Zapata Luis.

Este artículo fue sometido a Plant Cell Reports, 2007

3.1. ABSTRACT

All forms of stress exert strong evolutionary pressure on all organisms. A catalase was found that showed differential expression due to stress in banana fruits and was coded as *MaCat2*. The complete sequence of *MaCat2* was isolated using 5'Race technique and the full length cDNA sequence contained 1,476 bp. Catalase mRNA expression in the banana peel increased in response to low temperature and mechanic damage but not for heat stress or during normal maturation process. Two copies of the *MaCat2* gene were detected by southern blot from the banana genome. The phylogenetic tree obtained in this study revealed that catalase *MaCat2* is related to a Catalase 2 from *Zantedeschia aethiopica*.

Keywords: *Musa acuminata*, catalase, low temperature.

3.2. INTRODUCTION

Catalase (CAT; H₂O₂:H₂O₂ oxidoreductase, EC 1.11.1.6) is a tetrameric, heme-containing enzyme that catalyzes the dismutation of H₂O₂ into H₂O and O₂ (Williamson and Scandalios 1992). Catalases, together with superoxide dismutases and hydroperoxidases, make up a defense system for the scavenging of superoxide radicals and hydroperoxides (Beyer and Fridovich, 1987). In different eukaryotic organisms three unlinked *Cat* structural genes, *Cat1*, *Cat2*, and *Cat3*, encode three biochemically distinct isozyme subunits, CAT-1, CAT-2, and CAT-3 (Williamson and Scandalios 1992). Many plants contain multiple catalase isozymes, from two isozymes in castor bean (Ota *et al.*, 1992),

three in tobacco (Havir and McHale, 1987), five each in spinach (Galson *et al.*, 1951), maize (Williamson and Scandalios, 1992), and cotton (Ni *et al.*, 1990), to as many as 12 in mustard (Drumm and Schopfer, 1974). Small families of catalase genes have been described for castor bean (Suzuki *et al.*, 1994), *N. plumbaginifolia* (Willekens *et al.*, 1994a, 1994b), and maize (Scandalios, 1987, 1990). To date, three distinct *Arabidopsis thaliana* catalase genes have been isolated using different approaches. The first, *Cat2*, was identified by screening a cDNA expression library with antibodies to pumpkin catalase (Chevalier *et al.*, 1992). The second, *Cat3* (previously called *Cat1*), was identified in the *Arabidopsis* EST database by sequence homology to *Cat2* (Newman *et al.*, 1994).

Catalase from plants are differentially regulated depending the type of tissues or the stage of development, as well as by a variety of environmental stresses (Esaka *et al.*, 1997; Mcclung, 1997; Scandalios *et al.*, 1997; Willekens *et al.*, 1994a; 1994b; Yi *et al.*, 2003). The presence of multiple isoforms, and their complex regulation, suggest that each of isoform plays a different role. The catalase isoforms encoded by *Nicotiana plumbaginifolia* *Cat1* are thought to play a photorespiratory role in leaves (Willekens *et al.*, 1994a; 1997), and it has been suggested that *Arabidopsis* *Cat2* plays a similar role, as it has a similar expression pattern to *N. plumbaginifolia* *Cat1* (Frugoli *et al.*, 1996). Two tobacco catalases are regulated by salicylic acid (SA), a well-known regulator of catalase gene expression, while rice has an SA-insensitive catalase (Chen *et al.*, 1997; Durner and Klessig, 1996); SA-sensitive catalase also indicates its involvement in systemic acquired resistance to pathogens (Chen *et al.*, 1993). In *Capsicum annuum* and *Triticum aestivum* there is evidence that *Cat1* and *Cat2* were regulated differently during the circadian rhythm or for a severe drought treatment (Luna *et al.*, 2005; Lee and An, 2005). In chilling-sensitive plants oxidative stress is a characteristic symptom, active oxygen species (AOS) such as hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide radicals (O_2^-) and hydroxyl radicals (OH^-) is generated and these can react very rapidly with DNA, lipids and proteins causing severe cellular damage (Van Breusegem *et al.*, 1999). In plants excessive production of AOS is an intrinsic characteristic of the stressed metabolism under abiotic stress as is the case of low temperature damage (Apel and Hirt 2004). If growth and development take place at below-optimum temperature, several important life functions will suffer inhibition,

including the photosynthetic apparatus, which is particularly susceptible to the negative effects of low temperature. Low temperature-induced photoinhibition which has an important role in the chilling damage to young maize plants (Janda *et al.* 1994). In our laboratory we carrying out differential display experiments that provided several low temperatures expressed partial sequences, among these we found a catalase that is expressed in peel of banana fruits exposed to 10 °C (Caamal-Velazquez *et al.*, 2007).

A significant number of catalase sequences have been reported; Guan and Scandalios (1996) described a phylogenetic reconstruction of 16 plant catalase sequences and discussed possible evolutionary relationships to bacterial and other eukaryotic catalases. In addition, Mayfield and Duvall (1996) described anomalous groupings of catalase gene sequences using a subset of nine bacterial and five eukaryotic sequences. Both of these reports utilized small subsets of the total number of catalase sequences available, leaving in question the overall phylogenetic relationships within the larger family. Recently Chelikani and Loewen (2004) analyzed 300 catalases sequences from different procariotic and eucariotic organisms where approximately 225 are monofunctional, 50 are bifunctional with a heme-group bind site and 25 are catalases that contain magnesium bind site. Willekens *et al.*, (1994a) reported 17 cDNAs-catalases from different plants; there is a growing interest of these enzymes to find specific correlation of phylogeny and function within these groups, as catalases from the same type can play different specific roles. Here we show the complete sequence of a catalase 2 from the banana with particular expression profile in fruit during low temperature and mechanic damage and its phylogenetic comparison to the known 91 plant catalase reported up to date.

3.3. MATERIAL Y METHODS

3.3.1. MATERIAL AND STRESS INDUCTION TREATMENTS

Bananas fruits (*Musa acuminta* cv "Grand Naine") were obtained from banana plants grown in the nursery. The fruits were harvested in the fourth stage of ripening; according to the stage proposed to Customers Services Department Chiquita Brands, Inc., Cincinnati, OH. Fruits were incubated at room temperature (23°C) or 10°C for 8 hours (Caamal-Velazquez *et al.*, 2007). Likewise fruit were exposed to wounding, high

temperature 45°C for 8 hours and maturation. Banana fruits (pulp and peel) were collected and frozen in liquid nitrogen. Likewise 6 month old banana plants were used as a source for the different tissues (Leaf, pseudosteam, corm and root). These plants were incubated to 10 °C for 24 h, and the vegetative material were collected and frozen in liquid nitrogen.

3.3.2. TOTAL RNA EXTRACTION

Total RNA was obtained according to the protocol proposed by Medina-Escobar, et al., (1997). Briefly, 2 g of fruit tissue (peel or pulp) were frozen in liquid nitrogen and ground. The ground material was homogenized in 10 ml of RNA extraction buffer (100 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA pH 8 and 500 mM NaCl); 1.4% β-Mercaptoethanol and 2% SDS and the homogenized was incubated for 15 min at 65°C. After of this incubation, 1.5 M potassium acetate was added to the mixture, and the samples were incubated for 10 min at -20°C; the supernatant was obtained by centrifugation for 30 min at 4°C. The aqueous phase was recovered, and the total RNA was precipitate by addition of one volume of isopropanol; the samples were incubated for 1 h at -20 °C and centrifuge for 30 min at 4 °C. The pellets were resuspended with TE (100mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA pH 8), and 300 mM acetate sodium and 50 % isopropanol was added to the mixture; the samples were incubated overnight at -20 °C and centrifuged; the pellets were washed with 70 % EtOH, centrifuged and resuspended with nuclease free-water.

3.3.3. ISOLATION OF THE 5' END OF CAT2 TRANSCRIPT BY 5' RACE INVITROGEN GENERACER KIT

The 5' end of the *Cat 2* transcript was cloned and identified with GeneRacer kit (Invitrogen) using gene-specific *MaCat2* Race primer (5'-GATAAACATGCCGCGG ACTTGACA-3'). Total RNA from banana fruits was first treated with calf intestinal phosphatase to dephosphorylate the 5'-ends of any truncated mRNA. After the synthesis of the first strand cDNA using the oligo- [dT] primer with Superscript II RNase H- reverse transcriptase, the 5'-end of the *Cat 2* mRNA was amplified by PCR followed by nested PCR according to the procedure described in the GeneRacer kit using *Cat 2* gene specific

primers, and the 5' primer and nested 5' primer supplied by the kit. The PCR products were separated in 1 % agarose gel, and the band was isolated using the GENE CLEAN® II KIT (Q-Biogene). The isolated bands were cloned into the pGEM®-T Easy vector (Promega) and transformed in *E. coli* strain DH10B by calcium protocol transformation (Sambrook and Russell, 2001). *Cat 2* gene was sequenced and analyzed using Blast database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) and the ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) (Altschul et al., 1990; Gish and States, 1993). Edited sequences were loaded into National Center for Biotechnology Information form for BLAST (9.1) searching on a network server (www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.3.4. SEQUENCE DATA AND PHYLOGENETIC ANALYSIS

The amino acid sequences encoded by the 90 different catalase sequences from plants were obtained from GENBANK using BLAST database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) (Table. 3.3.4.1). The initial alignment of amino acid sequences was made using multiple sequence alignment CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) and refined with the software DNASTAR 5.08/5.03, (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) and BOXSHADE (<http://searchlauncherbcm.tmc.edu/multialign/multi-align.html>). The WINCLADA/NONA program was used for phylogenetic and molecular evolutionary analyses based on the Maximum parsimony of Ratchet and 1000 jackknife replications as a test of inferred phylogeny. The resulting rooted tree topology was obtained with strict consensus.

3.3.5. RNA BLOT ANALYSIS

Total RNA (10 µg) was isolated from different tissue of banana plants or from banana fruits. These tissues were exposed to different abiotic stresses and separated by electrophoresis in 1.5% agarose gel contained formaldehyde. The nucleic acids were blotted onto a nylon membrane and hybridized with the *MaCat2* probe at 54 °C. RNA blot hybridization was performed as was described by Sambrook and Russell (2001). Membranes were washed according to protocol of Gene Images AlkPhos Direct Labeling and Detection System (Amersham/Biosciences). The specific band for *MaCat2* was visualized

by autoradiography at 24 °C for 1 h (HyperfilmtmECL, Amersham/Bioscience).

3.3.6. DNA-BLOT ANALYSIS

Genomic DNA from banana plants was isolated from different tissue of banana plants using the protocol described by Dellaporta (1983). DNA was digested using BamH1 and EcoRI, and then run on a 1% agarose gel and transferred to nylon membrane. The membrane was dried and hybridized with a *MaCat2* probe at 54 °C. Membranes were washed according to protocol of Gene Images AlkPhos Direct Labeling and Detection System (Amersham/Biosciences). The specific band for *MaCat 2* was visualized by autoradiography at 24 °C for 2 h (HyperfilmtmECL, Amersham/Bioscience).

3.3.7. RT-PCR ANALYSIS OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES.

To confirm differential expression of *MaCat 2* gene we performed semiquantitative RT-PCR using specific primers for the *MaCat2* gene. The *MaCat2a* and *MaCat2b* primer sequences 5'-ATGGATCCTTACAAGTTCC -3' (forward) and 5'-GATAACATGGGCCGGACTTGACA 3' (reverse), respectively. PCR system (Master cycler eppendorf) was used to reverse transcribe and amplify total RNA. Different PCR cycle numbers were tested for each gene to ensure that the assay was in the linear range of amplification. The housekeeping 18S gene was amplified from each sample to normalize the level of each test gene; the primer sequence for the 18S gene were: 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA -3' (forward); 18S, 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3' (reverse). PCR products were run on a 2% agarose gel. Quantitation was carried out by digital analysis of band intensity in the gel; QualityOne software (version 4.6.2.) contained in the BioRAD Gel Documentation System (BioRAD).

3.4. RESULTS

3.4.1. FULL LENGTH SEQUENCE CDNA OF BANANA CATALASE 2

A fragment of a banana fruit catalase 2 was identified by differential display in response to low temperatures (Caamal-Velazquez *et al*

2007). In an effort to characterize its differential expression in banana fruit in response to different abiotic stress the full length sequence of catalase gene was obtained by 5'RACE. The full size of the nucleic acids sequence of the banana catalase was of 1,476 bp, and it is encode a predicted protein of 494 amino acid residues. The deduced amino acid sequence indicated the presence of a catalase activity motif (FARERIPERVVHARGAS) with a conserved Histine 65; and a catalase heme bind site (RVFAYGDTQ) which contain a conserved tyrosine 348 (figure 3.4.1.1).

Figure 3.4.1.1. Full length sequence of amino acid of *MaCAT2*. The deduced amino acid sequence indicated the presence of a catalase activity motif (FARERIPERVVHARGAS) with a conserved Histine 65; and a catalase heme bind site (RVFAYGDTQ) which contains a conserved tyrosine 348.

3.4.2. EFFECTS OF ABIOTIC STRESSES IN THE CAT2 EXPRESSION IN FRUITS AND BANANA PLANTS

The effect of the abiotic stresses on the *MaCat2* expression was compared in fruits and banana plants. We used Northern blotting assay and semiquantitative PCR to investigate *MaCat2* expression in banana fruits. Banana fruits were exposed to 10 °C or 25 °C. We observed after 8 hours exposure to the low temperature treatment that different injury symptoms begun to appear in the banana subepidermal tissues revealing dark-brown streaks due to this stress (figure 3.4.2.1A). Nucleic acid hybridization experiments suggest that *MaCat2* transcript accumulation increase dramatically in banana peel instead of banana pulp at 10 °C (see figure 3.4.2.1B). Semiquantitative PCR corroborated this result of the *MaCat2* gene expression at 10 °C (see figure 3.4.2.1C). We detected a strong signal of the *MaCat2* gene expression in banana peel exposed at 10 °C and a lower signal when exposed at 25 °C. However, in the banana pulp the *MaCat2* transcript accumulation was drastically lower at 25 °C and almost not perceptible at 10 °C. We observed that the *MaCat2* transcript accumulation increase to mechanical damage and but not to high temperature exposure (45 °C) or during fruit maturation (see figure 3.4.2.1D). Likewise we observed that *MaCat2* transcript can be found in leaves but not in other banana tissue (figure 3.4.2.2A). Semiquantitative PCR showed no changes in the expression of *MaCat2* in banana roots (figure 3.4.2.2B).

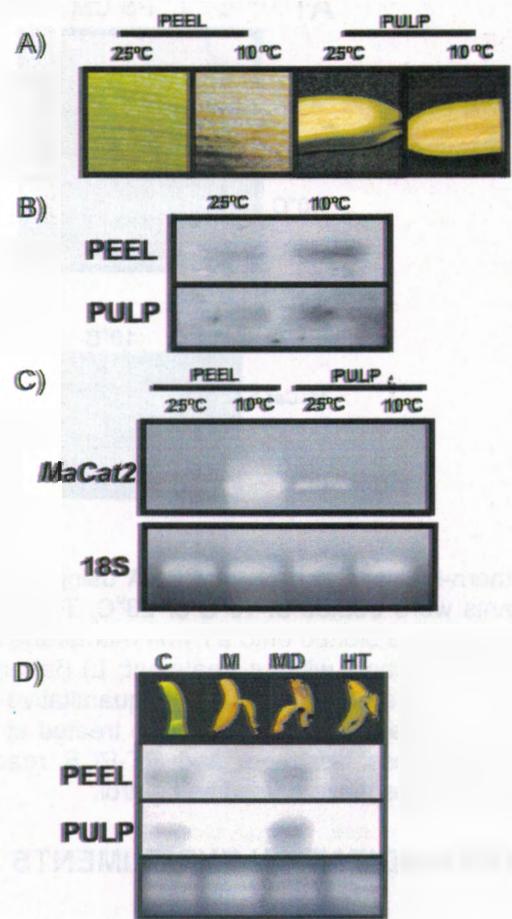


Figure 3.4.2.1. Differential accumulation of the *MaCat2* transcripts in banana fruits in response to low temperature. A) Chilling injury symptoms after of 8 hours to low temperature treatment in banana fruits using 10°C or 23°C (room temperature). B) Northern-blots analysis of total RNA from the banana peel or banana pulp treated at 10°C or 23°C. The blots were obtained and they were hybridized to *MaCat2* probe. C) Semiquantitative RT-PCR using specific primers for the *MaCat 2* gene. Banana fruits were treated at 10°C or 23°C. mRNA was extracted for each stress treatment and RT-PCR reaction was carried out. Specific primers for the 18S gene were used as control. D) Different stresses produce a differential accumulation of the *MaCat2* transcripts in banana fruits. Banana fruits were submitted at different stress and total RNA was isolated from each treatment; and they were blotted onto a nylon membrane and hybridized with the *MaCat2* probe. C) Banana fruits without treatment; M) Maturation process; MD) Mechanic damage and HT) Heat temperature.

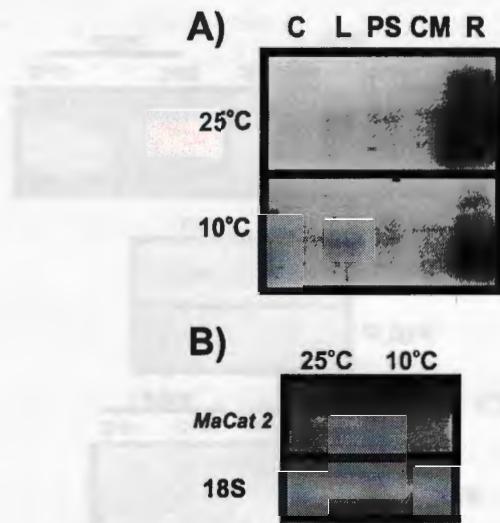


Figure 3.4.2.2. Northern-blot analysis of total RNA using different tissue of banana plant. A) Banana plants were treated at 10°C or 23°C. Total RNA was isolated from each treatment; and they were blotted onto a nylon membrane and hybridized with the *MaCat2* probe. C) Banana plants without treatment; L) Banana leaves; PS) banana pseudostem; CM) Corm; R) Banana roots. B) Semiquantitative RT-PCR using specific primers for the *MaCat 2* gene. Banana plants were treated at 10°C or 23°C. mRNA was extracted for each stress treatment and RT-PCR reaction was carried out. Specific primers for the 18S gene were used as control.

3.4.3. DNA-DNA HYBRIDIZATION EXPERIMENTS

To determine the number of related catalase genes in *Musa acuminate* cv Gran Nain. We performed DNA-DNA hybridization studies. A 300 bp EcoR1 fragment from *MaCat2* gene, was used as a probe. Genomic DNA from *Musa acuminate* cv Gran Naine was digested with Eco RI and Hind III (Figure 3.4.3.1). Two fragments of 9 kb and 1.7 kb were observed using Eco RI restriction enzyme and two fragments of 3 kb and 4 kb respectively using the Hind III restriction enzyme. This result strongly suggests that there are two single catalase genes in the banana genome.

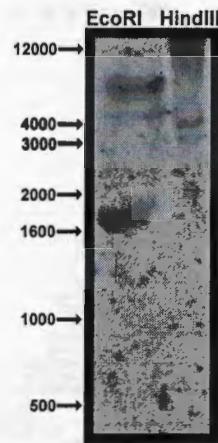


Figura 3.4.3.1. Southern analysis of *MaCat2* genes. Genomic DNA of banana plants were digested with EcoRI and, HindIII. Blots were hybridized with *MaCat2* probe.

3.4.4. PHYLOGENETIC ANALYSIS OF *MaCat2*

We undertook a comparison for the putative amino acid sequences from different plant catalases from GenBank database available sequences using the Maximum Parsimony of Ratchet and 1000 Jackknife Replications. Which is a non parametric statistics method to support their evolutionary relationships. To find the evolutionary relationship of *MaCat2* to other plant catalases, a phylogenetic tree was generated using full-length amino acid sequences. We obtained 91 catalases sequences related with *MaCat2* (figure 3.4.4.1). All sequences analyzed are listed in Table 3.4.4.1. A catalase from *Homo sapiens* (accession number CAA27721) was used as an outside group for the rooted tree since the amino acid sequence of the catalase from *Homo sapiens* was significantly different to plant catalases. The consensus phylogenetic tree obtained in this study revealed that catalase *MaCat2* is related to a Catalase 2 from *Zantedeschia aethiopica* (accession number AAG61140). The amino acid sequence between both catalases indicated the presence of a conserved hydroperoxidase domain and heme bind site (data not show). The clade between *MaCat2* and *ZaCat2* has a statistics support of 55%. These results suggest us that *MaCat2* and *ZaCat2* have identical regions in amino acids motif.

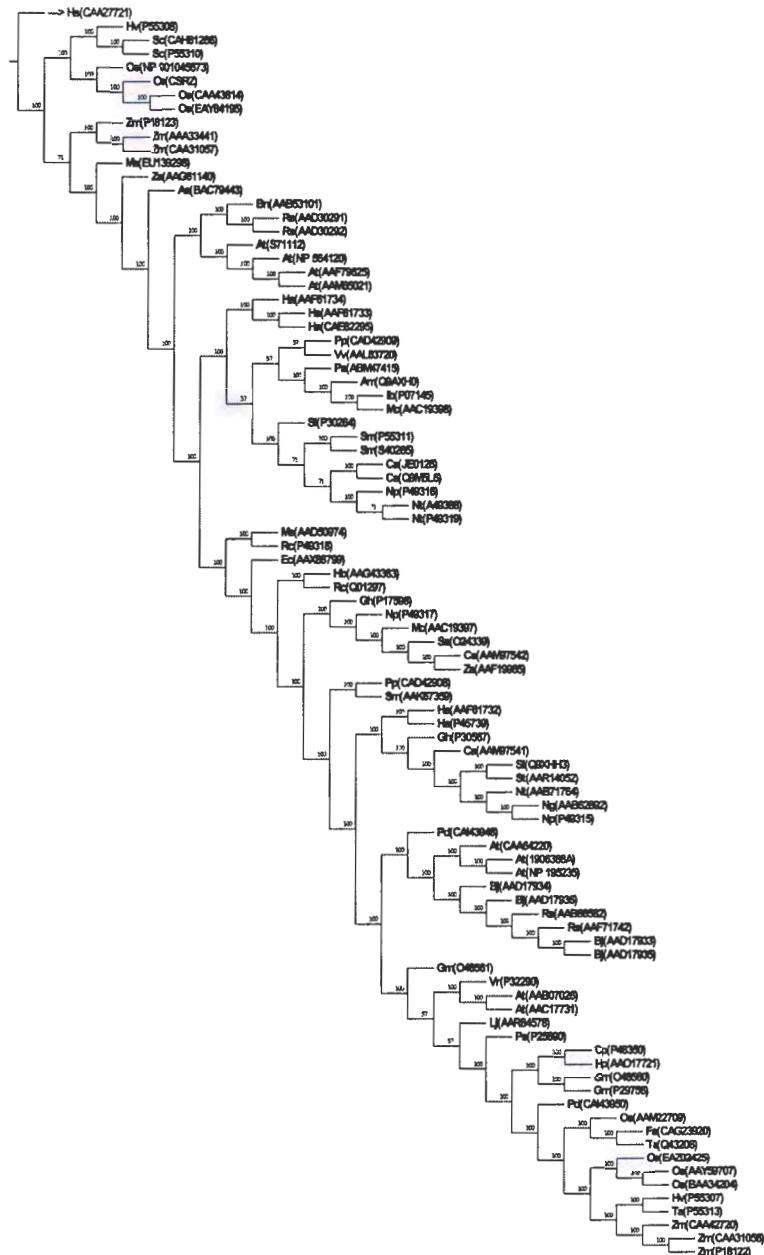


Figure 3.4.4.1. Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of 91 plant catalases constructed by parsimony methods.

Table 3.4.4.1. Sequences used in this study. Accession numbers for all sequences included in this evolutionary analysis, from the Gene Bank database and organisms from which they originate.

| Accession number | Organism | Definition |
|------------------|--------------------------------------|------------|
| CAA27721 | <i>Homo sapiens</i> | catalase |
| EU139298 | <i>Musa acuminata</i> | catalase 2 |
| AAG61140 | <i>Zantedeschia aethiopica</i> | catalase 2 |
| AAL83720 | <i>Vitis vinifera</i> | catalase |
| BAC79443 | <i>Acacia ampliceps</i> | catalase |
| CAD42909 | <i>Prunus persica</i> | catalase |
| P18123 | <i>Zea mays</i> | catalase |
| isozyme 3 | | |
| AAA33441 | <i>Zea mays</i> | catalase |
| isozyme 3 | | |
| CAA31057 | <i>Zea mays</i> | unnamed |
| protein | | |
| P55308 | <i>Hordeum vulgare</i> | catalase |
| isozyme 2 | | |
| CAH61266 | <i>Secale cereale</i> | catalase |
| EAY84195 | <i>Oryza sativa</i> | catalase |
| CSRZ | <i>Oryza sativa</i> | catalase A |
| CAA43814 | <i>Oryza sativa</i> | catalase |
| NP_001045673 | <i>Oryza sativa</i> | catalase |
| ABM47415 | <i>Prunus avium</i> | catalase |
| Q9AXH0 | <i>Avicennia marina</i> | catalase |
| AAC19398 | <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> | root |
| catalase | | |
| P07145 | <i>Ipomoea batatas</i> | catalase |
| AAF61734 | <i>Helianthus annuus</i> | catalase 4 |
| AAF61733 | <i>Helianthus annuus</i> | catalase 3 |
| CAE82295 | <i>Homogyne alpina</i> | catalase |
| AAB53101 | <i>Brassica napus</i> | catalase |
| AAD30291 | <i>Raphanus sativus</i> | catalase 2 |
| AAD30292 | <i>Raphanus sativus</i> | catalase 3 |
| AAF79625 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | catalase |
| AAM65021 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | unknown |
| NP_564120 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | catalase 3 |
| S71112 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | catalase |
| P30264 | <i>Solanum lycopersicum</i> | catalase |
| isozyme 1 | | |
| P55311 | <i>Solanum melongena</i> | catalase |
| S40265 | <i>Solanum melongena</i> | catalase |
| JE0126 | <i>Chloroplast Capsicum annuum</i> | catalase |
| Q9M5L6 | <i>Capsicum annuum</i> | catalase 1 |
| A49388 | <i>Nicotiana tabacum</i> | catalase |
| P49316 | <i>Nicotiana plumbaginifolia</i> | catalase |

| | | |
|----------------------|--------------------------------------|---------------|
| isozyme 2 | | |
| P49319 | <i>Nicotiana tabacum</i> | catalase |
| isozyme 1 | | |
| AAD50974 | <i>Manihot esculenta</i> | catalase 1 |
| P49318 | <i>Ricinus communis</i> | catalase |
| isozyme 2 | | |
| AAX88799 | <i>Euphorbia characias</i> | catalase |
| AAG43363 | <i>Hevea brasiliensis</i> | catalase |
| Q01297 | <i>Ricinus communis</i> | catalase |
| isozyme 1 | | |
| CAD42908 | <i>Prunus persica</i> | catalase |
| CAI43948 | <i>Populus deltoides</i> | catalase |
| CAI43950 | <i>Populus deltoides</i> | catalase |
| P17598 | <i>Gossypium hirsutum</i> | catalase |
| isozyme 1 | | |
| P25890 | <i>Pisum sativum</i> | catalase |
| AAO17721 | <i>Hypericum perforatum</i> | catalase |
| P48350 | <i>Cucurbita pepo</i> | catalase |
| isozyme 1 | | |
| O48560 | <i>Glycine max</i> | catalase 3 |
| P29756 | <i>Glycine max</i> | catalase |
| 1/2 | | |
| P32290 | <i>Vigna radiata</i> | catalase |
| AAB07026 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | catalase 1 |
| AAC17731 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | catalase 1 |
| O48561 | <i>Glycine max</i> | catalase 4 |
| AAR84578 | <i>Lotus japonicus</i> | catalase 1a |
| AAF19965 | <i>Zantedeschia aethiopica</i> | catalase 1 |
| O24339 | <i>Soldanella alpina</i> | catalase |
| AAM97542 | <i>Capsicum annuum</i> | catalase 3 |
| P49317 | <i>Nicotiana plumbaginifolia</i> | catalase |
| isozyme 3 | | |
| AAC19397 | <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> | leaf catalase |
| AAK67359 | <i>Suaeda maritima subsp. Salsa</i> | catalase |
| CAA64220 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | catalase |
| 1906388 ^a | <i>Arabidopsis thaliana</i> | catalase |
| NP_195235 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | catalase 2 |
| AAD17934 | <i>Brassica juncea</i> | catalase |
| AAD17933 | <i>Brassica juncea</i> | catalase |
| AAD17935 | <i>Brassica juncea</i> | catalase |
| AAB86582 | <i>Raphanus sativus</i> | catalase |
| AAD17936 | <i>Brassica juncea</i> | catalase |
| AAF71742 | <i>Raphanus sativus</i> | catalase |
| AAF61732 | <i>Helianthus annuus</i> | catalase 2 |
| P45739 | <i>Helianthus annuus</i> | catalase |
| P30567 | <i>Gossypium hirsutum</i> | catalase |
| isozyme 2 | | |

| | | |
|----------------------|----------------------------------|--------------------|
| AAM97541 | <i>Capsicum annuum</i> | catalase 2 |
| AAR14052 | <i>Solanum tuberosum</i> | catalase |
| Q9XHH3 | <i>Solanum lycopersicum</i> | catalase isozyme 2 |
| AAB62892 | <i>Nicotiana glutinosa</i> | catalase 1 |
| AAB71764 | <i>Nicotiana tabacum</i> | catalase 1 |
| P49315 | <i>Nicotiana plumbaginifolia</i> | catalase |
| AAM22709 | <i>Oryza sativa Putative</i> | catalase |
| CAG23920 | <i>Festuca arundinacea</i> | catalase |
| Q43206 | <i>Triticum aestivum</i> | catalase 1 |
| AAY59707 | <i>Oryza sativa</i> | catalase |
| BAA34204 | <i>Oryza sativa</i> | catalase |
| EAZ02425 | <i>Oryza sativa</i> | |
| hypothetical protein | | |
| P55307 | <i>Hordeum vulgare</i> | catalase |
| isozyme 1 | | |
| P55310 | <i>Secale cereale</i> | catalase |
| P55313 | <i>Triticum aestivum</i> | catalase |
| CAA42720 | <i>Zea mays</i> | catalase 1 |
| CAA31056 | <i>Zea mays</i> | catalase |
| P18122 | <i>Zea mays</i> | catalase |
| isozyme 1 | | |

3.5. DISCUSIÓN

Plants respond to diverse environmental signals in order to survive stresses (Pastori and Foyer, 2002). Strategies to minimize oxidative damage are a universal feature of plant defence responses. Catalases, or more correctly, hydroperoxidases, are one of the most studied classes of enzymes (Chelikani *et al.*, 2004). The full-length *Musa acuminta* cv Grand nain catalase cDNA was obtained from banana fruits by 5'RACE, being the first fruit catalase identified by molecular tools. The nucleic acids sequence of the banana catalase showed a similitude with the monocot *Zantedeschia aethiopica* Cat2 (ZaCat2). This *MaCat2* gene contained a hydroperoxidase domain catalytic and site containing-heme (Chelikani *et al.*, 2004, Klotz *et al.*, 1997). Cat2 has a consensus peroxisomal targeting sequence and catalase 2 mRNA accumulates rapidly after imbibition (Zhong *et al.*, 1994), consistent with a glyoxysomal role the destruction of H₂O₂, generated during the P-oxidation of fatty acids stored in the seed (Bewley and Black, 1994). Cat2 mRNA is most abundant in plant leaves and is found in all green (photosynthesizing) organs. Cat2 also exhibits a circadian rhythm in mRNA abundance with a peak abundance during the early subjective morning (Zhong *et al.*, 1994). The differential spatial and temporal

expression of these catalases isozymes in maize has been described (Scandalios et al., 1980; Chandle et al., 1984; Wadsworth et al., 1989; acevedo and Scandalios 1990). The *Cat2*isozyme begins to accumulate in the aleurone and scutella 20-22 days after postpollination. Upon inhibition, levels of *Cat2* increase, with the *Cat2* accumulation profile paralleling that of the glyoxysomes, the primary intracellular location of this isozyme (Williamson and Scandalios, 1992). We observed that *MaCat2* transcript level increased when banana fruits were exposed to low temperatures and mechanic damage, and not for high temperature stress o maturation process. There are several studies which support this result in plants. Prasat et al., (1994) and Willenkens et al., (1994a) found that the catalase transcript level increased when maize seeds and *Nicotiana plumbaginifolia* plants were exposed to low temperatures, respectively. Also Sakajo et al., (1987) reported an increment of the catalase mRNA expression caused by wounding sweet potato tuberous root tissue. In embryos and leaves of maize all Cat genes expression were upregulated in response to wounding and jasmonic acid (JA), raising the possibility that JA and wounding may share a common signal transduction pathway in upregulating Cat mRNA in immature embryos (Guan and Scandalios, 2000) . In addition they found that *Cat1* and *Cat3* transcript accumulation increased in response to wounding in both wild-type and mutant leaves deficient in abscisic acid (ABA), implying that *Cat1* and *Cat3* induction in response to wounding is not mediated by ABA in the leaves. Our result indicate that *MaCat2* may be also participating in the signal transduction cascade sense by low temperature and mechanic damage. We found that *Musa acuminate* cv Grand nain contains at least two copy of the *MaCat2* gene. Many reports suggest that plant genomes has evolved several catalase genes to satisfy the specific demands upon various cellular processes (Esaka et al., 1997; Frugoli et al., 1996; Scandalios et al., 1997; Willekens et al., 1994a; 1994b). In the case of other plants different copy number of the same catalase genes has been identified in castor bean (Ota et al., 1992), in tobacco (Havir and McHale, 1987), in spinach (Galston et al., 1951), in maize (Williamson and Scandalios, 1992), in cotton (Ni et al., 1990) and in mustard (Drumm and Schopfer, 1974). The wide diversity of plant *Cat* sequences has led to some discrepancies in the isozyme correlation in phylogenetic trees (Iuna et al., 2005). In the case of banana *MaCat2* and *ZaCat2* have similar sequences and belong to the same clade of the phylogenic tree.

ZaCat2 gene appears to play an exclusive role in scavenging photorespiratory H₂O₂ during senescence and regreening, and is more phylogenetically related to the unspecific *Zea mays Cat3* and *Oryza sativa Cat1*. Multiple catalase genes in the plant genome have likely arisen by an initial duplication of a clade 1-type catalase gene. The expression products of these genes can assemble various different tetrameric isozymes, and the regulation of this may allow the synthesis of tissue-specific catalases (Frugoli *et al.* 1998; Klotz and Loewen, 2003).

Moreover, we found that the *MaCat2* was differentially expressed in the banana peel in response to low temperature. Based on these results, we speculate that these catalases may play a role in satisfying the cellular demands of the vascular system. Willekens *et al.* (1994a) suggested that class II catalases in the solanaceous cluster including *N. plumbaginifolia Cat2* and tomato *Cat1* may be associated with cellular functions such as lignification. We observed after 8 hours the banana subepidermal tissues revealed dark-brown streaks due to low temperature treatment. Chilling induces oxidative stress by accumulating ROS such as H₂O₂, which induces lipid peroxidation (Prasad *et al.*, 1994; Taylor *et al.*, 2002).

The fundamental question in cold acclimation is how plants perceive the low but nonfreezing temperatures that activate cold acclimation responses. New findings in the past year suggest that changes in membrane fluidity, cytoskeleton rearrangement, and calcium influxes are among the earliest events taking place in plants upon exposure to low nonfreezing temperatures (Browse and Xin, 2001). The expression of COR (cold responsive) genes has been shown to be critical in plants for both chilling tolerance and cold acclimation (Thomashow, 1999; Xiong *et al.*, 2002). *Arabidopsis* COR genes (*COR78/RD29A*, *COR47*, *COR15a*, *COR6.6*) encode LEA-like stress proteins. Further elucidation is needed for why chilling-tolerant plants in the range of 10 to 15°C are less sensitive than susceptible species. This may involve more effective antioxidative protection or a greater capacity of repair as suggested by Greer (1990). The induced thermo-tolerance after a heat-shock pretreatment appeared to some extent coincident with the maintenance of a slightly higher capacity for repair of both catalase and plastoquinone QB-binding reaction center protein D1 of PSII, although mechanisms of improved protection against photodegradation may also be involved (Greer, 1990). The limited and preliminary experiences with

recovery after photoinactivation at low temperature would be in accord with the hypothesis that repair processes are slower in a chilling-sensitive plant, such as cucumber, than in a chilling-tolerant plant, such as rye. Correspondingly, in rye leaves, periods of catalase deficiency were short, as compared to cucumber, after cold exposures in light. In addition, alternative antioxidants increased, H₂O₂ did not accumulate, and major photooxidative injury was not observed in rye (Volk and Feierabend, 1989). Further elucidation may indicate whether bleaching and photooxidative damage after cold exposures of cucumber leaves are related to the prolonged decline in catalase. Cucumber is the only plant for which an increase of the H₂O₂ content has been described after experimental catalase depletion (Omran, 1980).

3.6. ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported by CONACYT (SAGARPA-C01-2002-1714) and International Foundation for Science (C/3959-1). We thank for his agronomic technical support to Fernando Contreras, and also to Rosa Grijalva for her technical support. We also thank Luis Figueroa (Accesolab) for some kindly providing molecular reagents.

3.7. REFERENCES

- Acevedo A. and Scandalios J.G. 1990. Expression of the catalase and superoxido dismutase genes in mature pollen in maize. *theor. Appl. Genet.* 80, 705-711.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E. W., and Lipman D.J.. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Apel K, Hirt H, 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55:373-379.
- Bewley, J.D. and M. Black. 1994. Seeds: physiology of development and germination. Plenum Press, New York. 445 p.
- Beyer WF Jr, Fridovich I, 1987. Catalase with and without heme. In Mg Simic, Ka Taylor, JF Ward, C Von Somtag, eds, *Oxygen Radicals in Biology and Medicine*. Plenum, New York, pp 651-661.
- Browse John and Xin Zhanguo. 2001. Temperature sensing and cold acclimation. *Current Opinion in Plant Biology* 4:241–246
- Caamal-Velázquez J.H., Chi-Manzanero B.H., Canche-Yam J.J., Castaño E. Rodríguez-Zapata L.C. 2007. Low temperature induce differential expression genes in banana fruits. *Scientia Horticulturae*, vol. 114, issue 2, 83-89.
- Chandle J.M. and Scandalios J.G. 1984. Analysis of variants affecting the catalase (EC 1.11.1.6) developmental program in maize (*Zea mays*) scutellum. *Theor. Appl. Genet* 69, 71-77.
- Chen Z., Iyer S., Caplan A., Klessig D.F. and Fan B. 1997. Differential accumulation of salicylic acid and salicylic acid-sensitive catalase in different rice tissues. *Plant Physiol.* 114, 193-201.
- Chen Z, Silva H, Klessig DF, 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262: 1883-1886.

Chelikani P. I. Fita and Loewen P.C. 2004. Diversity of structures and properties among catalase. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 192-208.

Chevalier C, Yamaguchi J, McCourt P. 1992. Nucleotide sequence of a cDNA for catalase fro *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 99: 1726-1728.

Dellaporta S.L., Wood J. and Hicks J.B. 1983. A plant DNA minipreparation : Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1(4): 19.

Drumm H and Schopfer P. 1974. Effect of phytochrome on development of catalase activity and isoenzyme pattern in mustard (*sinapis alba* L.) seedlings. A reinvestigation. *Planta* 120: 13-30.

Drner J. and Klessig D.F. 1996. Salicilic acid is a modulator of tobacco and mammalian catalases. *J. Biol. Chem.* 271, 28492-28501.

Esaka M., Yamada N., Kitabayashi M., Setoguchi Y., Tsugeki R., et al 1997. cDNA cloning and differential gene expression of three catalases in pumpkin. *Plant Mol. Biol.* 33: 141-155.

Frugoli Julia A, Zhong Hai Honng, Nuccion Michael L, McCourt Peter, McPeek Mark A, Thomas and McClung C. Robertson 1996. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol.* 112: 327-336.

Frugoli, J. A., M. A. McPeek, T. L. Thomas, and C. R. McClung 1998. Intron loss and gain during evolution of the catalase gene family in angiosperms. *Genetics* 149:355-365.

Galson AW, Bonnichsen RK, Arnon DI, 1951. The preparation of highly purified spinach leaf catalase. *Acta Chem Scand* 5: 781-790.

Gish W. and States D. J., 1993. Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat Genet* 3:266-272.

Guan L., and Scandalios J.L. 1996. Molecular evolution of maize catalases and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic catalases. *J. Mol. Evol.* 42: 570-579.

Guan L.M. and Scandalios J.G. 2000. Hydrogen peroxide-mediated catalase gene expression in response to wounding. *Free Radical Biology and Medicine*, 28:1182-1190.

Greer D. 1990. The combined effects of chilling and light stress on photoinhibition of photosynthesis and its subsequent recovery. *Plant Physiol Biochem.* 28: 447-455.

Havir EA and McHale NA. 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple form of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol* 84: 450-455.

Janda T, Szalai G, Kissimon J, Páldi E, Marton C, Szigeti Z, 1994. Role of irradiance in the chilling injury of young maize plants studied by chlorophyll fluorescence induction measurements. *Photosynthetica* 30:293-299.

Klotz M. G. and Loewen P. C. 2003. The molecular evolution of catlatic hidroperoxidases: evidence for multiple lateral transfer of genes between prokaryota and from bacteria into eukaryota. *Mol. Biol. Evol.* 20: 1098–1112.

Lee Sang Ho and An Chung Sun. 2005. Differential Expression of Three Catalase Genes in Hot Pepper (*Capsicum annuum* L.). *Mol. Cells* 20:247-255

Luna Celina M., Pastori Gabriela M., Driscoll Simon, Groten Karin, Bernard Stephanie and Foyer Christine H. 2005. Drought controls on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 56:417–423

Mayfield J.E. and Duvall M.R. 1996. Anomalous phylogenies based on bacterial catalase gene sequence. *J. Mol. Evol.* 42: 469-471.

Medina- Escobar N. J., Cárdenas V., Valpuesta, Muñoz-Blanco J. and Caballero J. L.. 1997. Cloning and characterization of cDNA from genes differentially expressed during the strawberry fruit ripening process by a MAST-PCR-SBDS method. *Analytical Biochemistry*. 248: 288-296.

McClung C.R. 1997. Regulation of catalases in *Arabidopsis*. *Free Radic. Biol. Med.* 23, 489-496.

Newman T, de Brujin FJ, Green P, Keegstra K, Kende H, McIntosh L, Ohlrogge J, Raihkel N, Somerville S, Thomashow M, Retzel E, Somerville C 1994. Genes galore: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous arabidopsis CADN clones. *Plant Physiol* 106: 1241-1255.

Ni W, Trelease RN, Eising R, 1990. Two temporally synthesized charge subunits interact to form the five isoforms of cottonseed (*Gossypium hirsutum*) catalase. *Biochem J* 269: 233-238.

Ota Y, Ario T, Hayashi K, Nakagawa T, Hattori T, Maeshima M, Asahi T. 1992. Tissue-specific isoforms of catalase subunits in castor bean seedlings. *Plant cell phisiol* 33: 225-232.

Omran RG. 1980. Peroxide Levels and the activities of catalase, peroxidase, and indoleacetic acid oxidase during and after chilling cucumber seedlings. *Plant Physiol* 65: 407-408.

Prasad Totempudi K., Anderson Marc D., Martin Barry A. and Steward Cecil R. 1994.. Evidence for chilling-induced oxidative estress in Maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* vol. 6, 65-74.

Sakajo S., Nakamura FK., Tadashi Ashai 1987. Increase in catalase mRNA in wounded sweet potato tuberous root tissue. *Plant cell physiology* 28, nº 5, 919-924

Sambrook J. and Russell D. W.. 2001. Molecular Cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.

Scandalios J.G, Tong W.F. and Roupakias D.G. 1980. *Cat3*, a 3rd gene locus coding for a tissue-specific catalase in maize (*Zea mays*): genetics, intracellular location and some biochemical properties. *Mol. Gen. Genet.* 179, 33-41.

Scandalios JG, 1987. The antioxidant enzyme genes Cat and Sod of maize: regulation, functional significance, and molecular biology. In MC Rattazi, JG Scandalios, GS Whitt, eds, *Isozymes: Current Topics in biological and medical research*. Alan R Liss, New York, pp 19-43.

Scandalios JG 1990. Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. *Adv Genet* 28:1-41.

Scandalios J.G., Guan L., and Polidoros A.N. 1997. Cabalase in plants; in *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidants defense*, Scandalios J.G. (ed.), pp. 343-406, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY.

Susuki M, Ario T, Hattori T, Nakamura K, Ashai T. 1994. Isolation and characterization of two tightly linked catalase genes from castor bean that are differentially regulated. *Plant Mol. Biol.* 25: 507-516.

Taylor N. L., Day D.A. and Millar A.H. 2002. Environmental stress causes oxidative damage to plant mitochondria leading to inhibition of glycine decarboxilase. *J. Biol. Chem.* 227, 42663-42668.

Thomashow MF, 1999. Plant cold acclimation: frezzing tolerance genes and regulatory mechanism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 571-599.

Van Breusegen F. Dekeyser R. Gielen J., Van Montagu M., and Caplan A. 1994. Characterization o fan S-adenosylmethionine syntetase gene in rice. *Plant Physiol.* 105. 1463-1464.

Volk S. and Feierabend J. 1989. Photoinactivation of catalase at low temperature and its relevance to photosynthetic and peroxide metabolism in leaves. *Plant Cell Environmant* 12: 701-712.

Wadsworth G.J. and Scandalios J.G. 1989. Differential expression of the maize catalase genes during kernel development: The role of steady-state mRNA levels
Dev. Genet 10, 304-310.

Willekens H, Langebartels C, Tiré C, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W. 1994a. Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.) Proc.Natl Acad Sci USA 91:10450-10454.

Willikens H, Villaroel R, Van Montagu M, Inzé D, Camp W. 1994b. Molecular identification of catalase from *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). FEBS Lett 352: 79-83.

Williamson J.D. and J.G. Scandalios. 1992. Differential response of maize catalases to abscisic acid: Vp1 transcriptional activator is not required for abscisic acid-regulated Catl expression. Proc. Nati. Acad. Sci. USA 89:8842-8846.

Xiong L, Chumaker KS, Zhu J-K. 2002. Cell signaling for cold, drought, and salt stress. The Plant Cell 14, s165-s183.

Yi S., Yu S., and Choi D. 2003. Involvement of hydrogen peroxide in repression of catalase in TMV-infected resistant tobacco. Mol. Cell 15, 364-369.

Zhong H.H, Young J.C, Pease E.A, Hangarter RP, McClung CR. 1994. Interactions between light and the circadian clock in the regulation of CAT 2 expression in *Arabidopsis*. Plant Physiology, 104, 889-898.

Capítulo IV. Discusión general

4.1. DISCUSIÓN GENERAL

El banano exige un clima cálido y una constante humedad en el aire. Necesita una temperatura media de 26-27 °C, con lluvias prolongadas y regularmente distribuidas. En aquellas zonas donde se presentan temperaturas inferiores a 20°C se produce un retardo en el desarrollo fisiológico de la planta, se retrasan la cosecha y la emergencia del brote o hijuelo. El crecimiento se detiene a temperaturas inferiores a 18°C. Se producen daños a temperaturas menores de 13°C y mayores de 45°C (Jones 1999). El daño causado por las bajas temperaturas en frutos de banano se pueden dar a dos niveles; el primero se da cuando la fruta se encuentra en la planta (pre-cosecha), y el segundo cuando la fruta es cosechada y esta se almacena en cuartos de refrigeración entre lo 4°C – 14 °C (pos-cosecha). A nivel de pre cosecha el daño que ocasionan las bajas temperaturas son una disminución en el tamaño de la fruta, así como una maduración irregular, oscurecimiento de la cáscara, entre otros síntomas que reducen la calidad de la fruta y por consiguiente produce pérdidas económicas a los productores. Por otro lado cuando la fruta es cosechada y almacenada en cuartos de refrigeración para su transporte también se presentan daños como son el oscurecimiento de la cáscara, el ablandamiento de la pulpa, una maduración irregular, se pierde el aroma y sabor de la fruta, aunado a estos síntomas puede existir el ataque de patógenos oportunistas que aprovechan este daño y por consiguiente la vida de anaquel se ve reducida o inclusive truncada.

La identificación de las moléculas de señalización que participan en la cascada de señalización a causa de un estrés abiótico, avanzó considerablemente, debido al uso de diferentes técnicas fisiológicas y bioquímicas. Actualmente el uso de diferentes técnicas de biología molecular ha permitido el aislamiento e identificación de algunos genes que codifican para esas moléculas de señalización a partir de diferentes modelos tales como *Arabidopsis thaliana*, Tabaco, Canola, Trigo, Arroz, etc. Como se menciono anteriormente en los antecedentes de esta tesis; estos genes se inducen tempranamente o tardíamente, por lo que se les denomina genes de respuesta temprana o genes de respuesta tardía. Los genes de respuesta tardía se activan

lentamente (horas), por lo cual su expresión es sostenida durante el tiempo que la planta es expuesta al estrés, como ejemplos podemos mencionar a los genes RD, COR, KIN y LT1; mientras que los genes de respuesta temprana, a menudo su expresión es transitoria (como ejemplos podemos mencionar a factores de transcripción tales como DREBs y CBF (Puebla y Del Viso, 2004).

En la actualidad existe una amplia gama de técnicas con las cuales se puede estudiar la respuesta de los frutos sometidos a diferentes estreses, entre estas técnicas podemos mencionar a los microarreglos (microarrays), las bibliotecas sustractivas (Subtraction library), el despliegue diferencial (Differential display), entre muchas otras; cada una de estas técnicas nos permite estudiar la expresión génica diferencial por lo cual son técnicas que nos permite identificar que genes se encuentran involucrados en un proceso definido. En este trabajo se utilizó el DD para estudiar el cambio en la expresión génica en frutos de banano sometidos a baja temperatura, esta es una técnica de exploración, en el cual no se requiere de un conocimiento previo para el estudio de la expresión génica, su costo es menor a otras técnicas exploratorias y el tiempo necesario para realizarla es corto con respecto a las demás técnica exploratorias. Esta técnica de DD permite simultáneamente identificar los genes que se encienden y se apagan en respuesta a este estrés, por lo que decidimos utilizar el DD.

Utilizando el DD logramos recuperar 105 fragmentos que se encienden o aumentan su expresión a baja temperatura en frutos de banano cv "Enano Gigante"; de los fragmentos antes mencionados podemos resaltar al fragmento 20-1C el cual detectamos su expresión en la cáscara de banano (figura 2.4.3.2.). Este fragmento su secuencia nucleotídica tuvo una homología con una proteína asociada a la maduración (Clendennen and May, 1997). El análisis bioinformático nos mostró que el fragmento 20-1C posee un motivo de lectina. Este tipo de genes se encuentran involucrados en diferentes cascadas de señalización, siendo moléculas receptoras a las que se les une diferentes ligandos de naturaleza glucosídica (Gouget *et al.*, 2006). Evidencias experimentales sugieren que las lectinas participan en el mecanismo de defensa de las plantas contra el ataque de microorganismos (Saha *et al.*, 2006), así mismo se menciona son responsables de la interacción carbohidrato-proteína y se consideran

compuestos críticos en la interacción entre la pared celular y la membrana plasmática (Timofeeva *et al.*, 2003). Se ha demostrado que en las infecciones fungicas o un daño mecánico, existe un incremento en la cantidad de lectina (Clendennen and May, 1997), de igual manera se ha documentado el aumento en la síntesis de lectinas en sequía o choque osmótico (Cammue *et al.*, 1989), salinidad y choque térmico (Shakirova *et al.*, 1996 y 1993), de acuerdo a los trabajos anteriores podemos mencionar el hecho que las lectinas están relacionadas con la comunicación celular y con el estrés tanto biótico como abiótico.

Otro fragmento que podemos mencionar es el fragmento 2-1C el cual su secuencia nucleotídica tuvo una homología de 98 % con una quitinasa tipo II de banano. Este gen se ha reportado que participa en respuesta al ataque de patógenos tales como fitohongos (Robi *et al.*, 1986, Bishop *et al.*, 2000). Por otra parte, también se ha reportado que estas moléculas pueden funcionar como anticongelantes retardando la formación de hielo extracelular (Hon *et al.*, 1995; Antikainen *et al.*, 1996; Griffith *et al.*, 1997), así mismo se ha encontrado un aumento en la expresión de una quitinasa de banano cuando los frutos son sometidos a un tratamiento con etilelo (Medina-Suárez *et al.*, 1997), así mismo se ha demostrado la expresión de quitinonas en frutos de aguacate sometidos a baja temperatura (Dopico *et al.*, 1993), así mismo en plantas de centeno (*Secale cereale*) se ha detectado la acumulación de 2 proteínas similares a quitinonas que actúan como proteínas anticongelantes (Yeh *et al.*, 2000). Estos datos sugieren que posiblemente el fragmento 2-1C que tiene una homología con una quitinasa tipo II este involucrado en la respuesta a un descenso de temperatura.

Por otro lado la secuencia del fragmento 17-3C (*MaCat 2*) mostró homología con una catalasa de *Zantedeschia aethiopica* *Cat2* (Lino-Neto *et al.*, 2004). En el caso de banano no encontramos una secuencia similar reportada en el GenBank por lo que decidimos realizar estudios más profundos concernientes a este fragmento. Las catalasas son enzimas que convierten el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a oxígeno (O_2) y agua (H_2O), en las plantas las catalasas juegan un papel importante en la destoxicificación del H_2O_2 de las células el cual se genera de manera normal en la fotorespiración y la β oxidación de los lípidos, sin embargo también pueden actuar como antioxidantes en la

defensa, en respuesta a un estrés ambiental así como en un estrés oxidativo (Chelikani y Loewen, 2004). Utilizando la técnica de 5'RACE aislamos el gen completo que codifica para la *MaCat* 2. El *MaCat* 2 tuvo un tamaño de 1476 pb (492 aa). El análisis bioinformático nos señaló que el gen *MaCat* 2 posee dos dominios que son característicos de las catalasas tipo 2; los cuales son: un dominio de hidroperoxidasa y un segundo dominio de unión al grupo Heme (Chelikani *et al.*, 2004, Klotz *et al.*, 1997).

Los experimentos de hibridación de ácidos nucleicos (Dot blotting y Northern blot) sugieren que existe una expresión diferencial del gen *MaCat* 2 en fruto de banano que fueron sometidos a una baja temperatura y a un daño mecánico (Figuras 2.4.3.1. y 2.4.3.2), pero no a otro tipo de estrés y al proceso de maduración. Esta expresión diferencial del gen *MaCat* 2 también se presentó en las hojas de plantas de banano sometidas a 10 °C, y no a nivel de raíces de banano en respuesta a un descenso de temperatura (figura 3.4.2.2.). Estudios a nivel molecular utilizando semillas de maíz, plantas de *Nicotiana plumbaginifolia* y raíces de camote sugieren que existen catalasas cuya expresión a nivel de transcripto se modifica en respuesta a un descenso de temperatura (Prasat *et al.*, 1994; Willenkens *et al.*, 1994a; Sakajo *et al.*, 1987), lo cual sustentan los datos obtenidos en nuestro estudio, utilizando frutos de banano.

Diferentes estudios resaltan que existen varias copias de genes de catalasas las cuales posiblemente estén participando en diferentes tipos de estreses (Esaka *et al.*, 1997; Frugoli *et al.*, 1996; Scandalios *et al.*, 1997; Willenkens *et al.*, 1994a; 1994b). Esta gran diversidad en las secuencias de catalasas ha llevado a algunas discrepancias en estudios filogenéticos realizados en diversos organismos (Iuna *et al.*, 2005). En el caso de *MaCat2* se encontró que existe cierta similitud con la catalasa de *Zantedeschia aethiopica* (Cat 2); localizándose ambas secuencias en el mismo clado filogenético. En nuestro trabajo encontramos que en frutos de *Musa acuminata* cv "Enano Gigante" se encuentran dos copias del gen *MaCat2*. En otros estudios se ha demostrado que el número de copias de catalasas puede variar de acuerdo al organismos; entre estos podemos mencionar al *Ricinus communis* el cual contiene dos isomas (Ota *et al.*, 1992), en tabaco el cual contiene tres copias (Havir and McHale, 1987), en espinaca el

cual contiene 5 copias (Galston et al., 1951), en maíz el cual contiene 5 copias (Williamson and Scandalios, 1992), en algodón el cual contiene 5 isoformas (Ni et al., 1990) en *Brassica alba* el cual contiene 12 isoformas (Drumm and Schopfer, 1974) lo que nos da una idea de la diversidad de este tipo de genes.

En las plantas la producción excesiva de ROS como son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^-), es una característica intrínseca de un metabolismo estresado bajo varios estrés abióticos. Una eliminación inadecuada de las ROS lleva a un estrés oxidativo, lo que se caracteriza por reacciones nocivas sobre las proteínas, los lípidos y el ADN, lo que puede ocasionar un daño irreversible a las células. Posiblemente cuando se somete frutos a baja temperatura, posiblemente la primera estructura que sufre daño es la membrana celular la cual puede disparar la generación de ROS, este aumento debe ser compensado con la activación de enzimas capaces de eliminar estas ROS que son tóxicas para la célula, por lo que podemos sugerir que *MaCat2* posiblemente actúa en la destoxicificación de la célula provocada por las ROS. Sin embargo para poder dilucidar mejor como actúa esta catalasa en la respuesta y señalización del fruto sometido a baja temperatura es necesario realizar estudios con mutantes, ARN de interferencia, análisis de sobre expresión, etc.

Por el momento solo podemos mencionar que a bajas temperaturas se encienden genes relacionados con el estrés oxidativo (*MaCat2*), la señalización por medio de carbohidratos (Lectina) y el estrés por patógenos (Quitinasa) de manera que corroboramos el hecho de que en la respuesta al estrés existe un entrecruzamiento (crosstalk) en las vías de señalización y respuesta al estrés en general.

4.2. BIBLIOGRAFÍA

- Antikainen M, Griffith M, Zhang J, Hon AC, Yang DSC, Maunsbach KP, 1996. Immunolocalization of antifreeze proteins in winter rye leaves, crowns and roots by tissue imprinting. *Plant Physiol.* 110: 845-857.
- Bishop JG, Dean AM, Mitchell-Olds T, 2000. Rapid evolution in Plant chitinases: Molecular targets of selection in plant pathogen co-evolution. *PNAS* vol. 97 No. 10, 5322-5327
- Cammue B, Broekart W, Kellens T, Raikhel N, Peumans. 1989. Stress-induced accumulation of wheat germ agglutinin and abscisic acid in roots of wheat seedlings. *Plant. Phisiol.* 91. 1432-1435.
- Chelikani P. I. y Loewen P.C. 2004. Diversity of structures and properties among catalase. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 192-208.
- Clendennen S. K. y May G. D. 1997. Differential gene expression in ripening banana fruit. *Plant Physiol.* 115: 463-469.
- Dopico B, Lowe A, Wilson I, Merodio C, y Grierson D. 1993. Cloning and Characterization of avocado fruit mRNAs and their expression during ripening and low-temperature storage. *Plant Molecular Biology* 21: 437-449.
- Drumm H y Schopfer P. 1974. Effect of phytochrome on development of catalase activity and isoenzyme pattern in mustard (*sinapis alba L.*) seedlings. A reinvestigation. *Planta* 120: 13-30.
- Esaka M., Yamada N., Kitabayashi M., Setoguchi Y., Tsugeki R., et al, 1997. cDNA cloning and differential gene expression of three catalases in pumpkin. *Plant Mol. Biol.* 33: 141-155.
- Frugoli Julia A, Zhong Hai Honng, Nuccion Michael L, McCourt Peter, McPeek Mark A, Thomas and McClung C. Robertson, 1996. Catalase

is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol.* 112: 327-336.

Havir EA and McHale NA. (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple form of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol.* 84: 450-455.

Hon WC, Griffit M, Mlynarz A, Kwok YC, Yang DSC, 1995. Antifrezze proteins in winter rye are similar pathogenesis-related proteins, *Plant Physiol.* 109: 879-889.

Galston AW, Bonnichsen RK, Amon DI, 1951. The preparation of highly purified spinach leaf catalase. *Acta Chem Scand* 5: 781-790.

Gouget, A., Senchou, V., Govers, F., Sanson, A., Barre, A., Rouge, P., Pont-Lezica, L.R., Canut, H., 2006. Lectin receptor kinases participate in protein interaction to mediate plasma membrane-cell wall adhesions in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 140, 81–90.

Griffith M, Antikainen M, Hon WC, Maunsbach Kp, Yu XM, Chun JU, Yang DSC 1997. Antifrezze proteins in winter rye, *Phisiol. Plant* 100: 327-332.

Jones DR, 1999. Diseases of banana, Abaca and Enset, CAB internacional, Wallingford UK.

Khairulim R, Shakirova F, Maxinov I, Bezrukova. 1993. Change in level of lectin, abscisic and indolacetic acidol in the wheat plants infected whit Seprotia nodorum Berk. *Physiol Biochem. Cult plants* 25. 138-144.

Klotz Martin G., Klassen Glen R. and Loewen Peter C.f 1997. Phylogenetic Relationships Among Prokaryotic and Eukaryotic Catalases. *Biol. Evol.* 14(9):951-958.

Komarova E, Viskrebentsteva E, Trunova T. 1995. Lectin activity in winter wheat crowns during hardening. *Russ. Plant. Physiol.* 42: 612-615.

Lino-Neto Teresa, Conceição Piques Maria, Barbeta Cátia, Sousa Manuel F., Tavares Rui M, & Pais Maria Salome. 2004. Identification of *Zantedeschia aethiopica* Cat 1 and Cat 2 catalase genes and their expression analysis during spathe senescence and regreening. Plant Science vol. 167, 4: 889-898.

Luna Celina M., Pastori Gabriela M., Driscoll Simon, Groten Karin, Bernard Stephanie and Foyer Christine H. 2005. Drought controls on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. Journal of Experimental Botany, 56:417–423

Medina-Suárez R, Manning K, Fletcher J, Aked J, Bird C, y Seymour G. (1997) Gene expression in the pulp of ripening Bananas. Plant Physiol. 115: 453-461.

Ni W, Trelease RN, Eising R, 1990. Two temporally synthesized charge subunits interact to form the five isoforms of cottonseed (*Gossypium hirsutum*) catalase. Biochem J 269: 233-238.

Ota Y, Ario T, Hayashi K, Nakagawa T, Hattori T, Maeshima M, Asahi T. 1992. Tissue-specific isoforms of catalase subunits in castor bean seedlings. Plant cell phisiol 33: 225-232.

Prasad Totempudi K., Anderson Marc D., Martin Barry A. and Steward Cecil R. 1994. Evidence for chilling-induced oxidative estress in Maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. Plant Cell vol. 6, 65-74.

Puebla Andrea y Del Viso Florencia, 2004. Biotecnología y mejoramiento vegetal, capítulo 12, Tolerancia a factores abióticos. Edit. INTA, pp. 355-365.

Roby Dominique, Toppan Alain and Esquerré-Tugayé Marie Therese, 1986. Cell surfaces in Plant-Microorganism. plant Phisiol. 81: 228-233.

Sakajo S., Nakamura FK., Tadashi Ashai 1987. Increase in catalase mRNA in wounded sweet potato tuberous root tissue. Plant cell physiology 28, nº 5, 919-924

Scandalios J.G., Guan L., and Polidoros A.N. 1997. Cabalase in plants; in Oxidative stress and the molecular biology of antioxidants defense, Scandalios J.G. (ed.), pp. 343-406, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY.

Sharikova F, Bezrukiva M, Khairulin R. 1993. The increase in lectin level in wheat shoots under the action of salt stress. Izv. Russ. Acad. Sci. 1, 142-145.

Sharikova F, Bezrukiva M, Sayakhmetova I. 1996. Efect of the temperature shock on the dynamics of abscisic acid and wheat germ agglutinin accumulation in wheat cell culture. Plan. Growth Regul. 19, 85-87.

Timofeeva O, Khokhlova L, Chulkova Y, y Garaeva L. 2003. Cytoeskeleton-Induced alterations of Lectin activity in modification of the calcium signaling system. Bulg J. plant Physiol, Special issue 248-256.

Willekens H, Langebartels C, Tiré C, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W. 1994a. Differential expression of catalasa genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.) Proc.Natl Acad Sci USA 91:10450-10454.

Willikens H, Villaroel R, Van Montagu M, Inzé D, Camp W. 1994b. Molecular identification of catalase from *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). FEBS Lett 352: 79-83.

Williamson J.D. y Scandalios J.G. 1992. Differential response of maize catalases to abscisic acid: Vp1 transcriptional activator is not required for abscisic acid-regulated Cat1 expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 89 pp. 8842-8846.

Yeh S, Moffatt B.A, Griffith M, Xiong F, Yang D, Wiseman S.B, Sarhan F, Danyluk J, Xue Y.Q, Hew C.L, Doherty-Kirby A y Lajoie G. 2000. Chitinase genes responsive to cold encode antifreeze proteins in winter cereals. Plant Physiol. 124:1251-1263.

Capítulo V. Conclusión General.

5.1. CONCLUSIÓN GENERAL

En conclusión; los frutos de banano, contienen una alta cantidad de polisacáridos y polifenoles lo cual hace difícil la extracción de ácidos nucleicos. En este trabajo logramos establecer métodos para la extracción idónea de ácidos nucleicos de frutos de banano lo que nos permitió realizar los diferentes análisis de expresión con cierta calidad. Como primer dato pudimos percatarnos que al someter los frutos de banano cv "Enano Gigante" a un tratamiento a baja temperatura estos fueron capaces de modificar su expresión genética, por lo que pudimos identificar la expresión de genes relacionados con la maduración, el estrés oxidativo, el estrés por patógenos, entre otros .

En este trabajo se realizaron estudios moleculares alrededor de la catalasa de banano (*MaCat 2*). Esta catalasa resultó ser una catalasa tipo II la cual específicamente es expresada a baja temperatura y a daño mecánico en frutos de banano. Filogenéticamente esta catalasa se encuentra con un alto grado de homología con la catalasa 2 de *Zantedeschia aethiopica*, debido a que ambas especies (*Z. aethiopica* y *M. acuminata*) pertenecen a las monocotiledóneas, lo cual explica de manera parcial su alta homología. Las catalasas son familias multigenicas por lo que no es inaudito encontrar dos copias del gen *MaCat2* en el genoma de banano.

Capítulo VI. Perspectivas del Trabajo

6.1. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

En principio, se sugiere realizar estudios de expresión génica (utilizando el Despliegue Diferencial) en especies *Musa balbisiana* silvestres las cuales se ha reportado que presentan cierta tolerancia a diferentes estreses abióticos, esto permitirá saber que genes se expresan a bajas temperaturas y la consecuencia de su capacidad de tolerar a estas temperaturas. Dicha información permitirá conocer científicamente porque cultivares de banano son susceptibles a los descensos de temperatura tal como es el caso de *Musa acuminata*. Así mismo se sugiere la realización de bibliotecas de cADN de frutos y plantas tanto a nivel de "Enano Gigante" como en las especies silvestres, esto permitirá aislar los cADN completos de los genes que resulten de interés. En cuanto a los fragmentos de genes diferenciales obtenidos en banano cv "Enano Gigante" se sugiere estudiar los fragmentos que no presentaron homología con algún gen reportado en las bases públicas (GeneBank, EBI, etc.); podemos sugerir específicamente el estudio del fragmento 22-5P cuya expresión a bajas temperaturas se presentó en frutos de banano realizando pruebas tipo dot blot. Pruebas tipo Norther Blot y PCR cuantitativos permitirán evidenciar su expresión específica a baja temperatura ya sea a nivel de fruto como en otros órganos de la planta. Asimismo se sugiere utilizar este gen para obtener plantas transgénicas en las cuales se sobre exprese este gen, con la finalidad de confirmar su participación en la cascada de señalización producida por un descenso de temperatura.

Por otro lado me permito sugerir un análisis más profundo de la expresión y participación de la catalasa tipo II (*MaCat 2*) utilizando la técnica de ARN de interferencia. Dichos estudios permitirán determinar la funcionalidad de este gen en la respuesta a las bajas temperaturas. De corroborarse la expresión específica de la catalasa en respuesta al estrés abiótico, se podría realizar la búsqueda y clonación del promotor que controla la expresión de *MaCat 2* en cual utilizarse como una herramienta biotecnológica para el mejoramiento de las plantas cultivadas.

